

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

جمهوری اسلامی ایران

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد

عنوان پایان نامه:

بررسی اثر ۴-آمینوپیریدین در پیشگیری از بیماری پارکینسون در مدل
حیوانی ۶-هیدروکسی دوپامین در موش صحرایی نر

استاد راهنما: دکتر هاشم حقدوست یزدی

اساتید مشاور: دکتر حسین پیری

دکتر شهرام دارابی

دکتر محمود علیپور

نگارش: مرضیه محمودی

سال تحصیلی ۹۵-۱۳۹۴

شماره پایان نامه:

تقدیم‌نامه

تقدیم به پدر و مادر عزیز و مهربانم،

این دو معلم بزرگوارم... که همواره بر کوتاهی و درشتی من، قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت‌هایم گذشته‌اند و در تمام عرصه‌های زندگی یار و یآوری بی‌چشم‌داشت برای من بوده‌اند.

و همسرم،

به پاس قدردانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از سلامت و امنیت و آسایش برای من فراهم آورده است.

و تقدیم به دختر بی‌همتایم بنیتا،

او که امیدبخش جانم است و آسایش او آرامش من است.

سپاس نامه

نگارنده بر خود لازم می‌داند از زحمات اساتید و دانشجویان صمیمی و مهربان گروه آناتومی و فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی قزوین به‌خصوص اساتید ارجمند جناب آقای دکتر هاشم حقدوست، جناب آقای دکتر شهرام دارابی و جناب آقای دکتر حسین پیری که با راهنمایی‌های خود راهگشای این جانب بوده‌اند، قدردانی و تشکر نماید.

همچنین از دوست و همکار عزیزم سرکار خانم زیبا دره‌زرشکی که در نگارش این رساله مرا یاری نمودند تشکر می‌نمایم.

چکیده

زمینه: فعالیت آنزیم‌های نوکلئاز و کاسپاز که پیام‌های مرگ را هدایت و تقویت می‌کنند و از این طریق سبب مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها می‌شوند، وابسته به یون پتاسیم است.

هدف: مطالعه به منظور تعیین اثر مهارکننده کانال‌های پتاسیمی ۴-آمینوپیریدین (4-AP) بر پیشگیری از بیماری پارکینسون در مدل حیوانی انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۲ در دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. موش‌های صحرایی نر از قبل از دریافت سم ۶-هیدروکسی‌دوپامین (6-OHDA) تا ۷ یا ۱۵ روز پس از آن دوزهای مختلف 4-AP را دوبار در روز دریافت کردند. 6-OHDA در گروه‌های مدل حاد به ناحیه دسته مغزی جلویی (MFB) و در گروه‌های مدل مزمن به استریاتوم در مغز تزریق شد و شدت پارکینسونیسم توسط آزمون‌های رفتاری متداول ارزیابی شد.

یافته‌ها: در گروه‌های مدل حاد، 4-AP با دوز کم ۵/۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلو وزن بدن ($n=9$) اثر قابل ملاحظه‌ای بر علایم رفتاری بیماری نداشت، ولی در دوز زیاد ۱ میلی‌گرم ($n=8$) سبب کاهش معنی‌دار شدت چرخش‌های القا شده با آپومرفین و تا اندازه‌ای بهبود یادگیری حرکتی در آزمون روتارد شد. در گروه‌های مدل مزمن اگرچه دوز ۱ میلی‌گرم 4-AP ($n=7$) اثر معنی‌داری بر کاهش شدت چرخش‌ها و بهبود یادگیری حرکتی نداشت، ولی دوز کم ($n=8$) این مهارکننده بسیار موثرتر بود.

نتیجه‌گیری: پیش‌درمان با 4-AP می‌تواند مرگ نوروئ‌های دوپامینرژیک توسط سم 6-OHDA را کاهش دهد. از آنجا که مدل مزمن 6-OHDA بیش‌تر شبیه بیماری پارکینسون در انسان است دوزهای پایین 4-AP برای درمان این بیماری توصیه می‌شود.

کلید واژه‌ها: یون‌های پتاسیم، بیماری پارکینسون، ۴- آمینوپیریدین، ۶-هیدروکسی‌دوپامین، هسته جسم سیاه، آزمون‌های رفتاری

| | |
|-------------|---|
| چکیده فارسی | ۱ |
|-------------|---|

فصل اول: مقدمه

| | |
|---|----|
| ۱-۱- مقدمه و اهمیت موضوع | ۷ |
| ۲-۱- کلیات | ۱۰ |
| ۱-۲-۱- بیماری پارکینسون | ۱۰ |
| ۲-۲-۱- ساختمان و عملکرد عقده‌های قاعده‌ای | ۱۶ |
| ۳-۲-۱- نوروترانسمیترها | ۲۱ |
| ۴-۲-۱- مدل تجربی بیماری پارکینسون | ۲۳ |
| ۵-۲-۱- مدل‌های حیوانی بیماری پارکینسون | ۲۳ |
| ۶-۲-۱- آپوپتوز | ۳۱ |
| ۷-۲-۱- کانال‌های پتاسیمی | ۳۶ |
| ۸-۲-۱- مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی | ۴۱ |
| ۹-۲-۱- آمینوپیریدین | ۴۲ |
| ۳-۱- اهداف و فرضیات | ۴۵ |

فصل دوم: مروری بر متون

| | |
|-----------------|----|
| ۱-۲- بررسی متون | ۴۷ |
|-----------------|----|

فصل سوم: مواد و روش‌ها

| | |
|---|----|
| ۱-۳- مواد | ۵۴ |
| ۲-۳- نمونه‌حیوانی و گروه‌های آزمایشی | ۵۵ |
| ۳-۳- طراحی تحقیق | ۵۶ |
| ۴-۳- روش انجام برای گروه‌های حاد | ۵۷ |
| ۵-۳- روش انجام برای گروه‌های مزمن | ۶۱ |
| ۶-۳- آزمون‌های رفتاری | ۶۲ |
| ۷-۳- روش جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل داده‌ها | ۶۵ |

فصل چهارم : نتایج و یافته‌ها

- ۱-۴- نتایج مربوط به آزمون چرخش القا شده با آپومورفین ----- ۶۸
- ۲-۴- نتایج مربوط به آزمون پیچش بدن بالا رفته ----- ۷۲
- ۳-۴- نتایج مربوط به آزمون روتارود ----- ۷۶

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

- ۱-۵- بحث ----- ۸۲
- ۲-۵- نتیجه‌گیری ----- ۸۷
- ۳-۵- پیشنهادات ----- ۸۷

منابع ----- ۸۸

- چکیده انگلیسی ----- ۹۳

| | |
|--|----|
| شکل ۱-۱: اجزای عقده‌های قاعده‌های | ۱۶ |
| شکل ۲-۱: مقایسه جسم‌سیاه در فرد سالم و فرد مبتلا به پارکینسون | ۲۰ |
| شکل ۳-۱: مسیرهای آپوتوز | ۳۶ |
| شکل ۱-۳: قرار دادن موش در دستگاه استرئوتاکس | ۵۸ |
| شکل ۲-۳: مشخص کردن محل تزریق | ۵۹ |
| شکل ۳-۳: تزریق سم | ۶۰ |
| شکل ۴-۳: تصویر دستگاه روتارود | ۶۵ |
| شکل ۱-۴: نمودار مربوط به آزمون چرخش القا شده با آپومورفین برای گروه‌های حاد | ۶۹ |
| شکل ۲-۴: نمودار مربوط به آزمون چرخش القا شده با آپومورفین برای گروه‌های مزمن | ۷۱ |
| شکل ۳-۴: نمودار مربوط به آزمون EBST برای گروه‌های حاد | ۷۳ |
| شکل ۴-۴: نمودار مربوط به آزمون EBST برای گروه‌های مزمن | ۷۵ |
| شکل ۵-۴: نمودار مربوط به آزمون روتارود برای گروه‌های حاد | ۷۸ |
| شکل ۶-۴: نمودار مربوط به آزمون روتارود برای گروه‌های مزمن | ۸۰ |

فصل اول

مقدمه

بیماری پارکینسون (PD) دومین بیماری شایع نورودژنراتیو بعد از بیماری آلزایمر است که ۲۰۰ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر به این بیماری مبتلا هستند. این بیماری بر اثر تخریب نورون‌های دوپامینرژیک واقع در بخش متراکم جسم سیاه (substantial nigra) بوجود می‌آید. دوپامین نیز یک ماده شیمیایی است که پیام‌هایی را از جسم سیاه به مناطق حرکتی مغز ارسال می‌کند و حرکت را کنترل می‌کند. زمانیکه در حدود ۶۰-۸۰٪ این سلول‌ها تخریب شوند و دوپامین به اندازه کافی تولید نشود علائم حرکتی بیماری پارکینسون ظاهر می‌شود. روش‌های درمانی معمول شامل دارو (L-DOPA, L-deprenyl, ...) و جراحی است. گرچه درمان با داروی L-DOPA بسیاری از علائم بیماری را برطرف می‌کند ولی پس از چند سال برخی علائم مجدداً عود می‌کنند که سبب پائین آمدن کیفیت زندگی می‌گردد بنابراین درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد و درمان‌هایی که صورت می‌گیرد در جهت کاهش علائم بیماری است از این رو در حال حاضر تحقیقات به سمت شناخت روش‌های نوین برای پیشگیری از بروز این بیماری است (۱-۴)

کانال‌های پتاسیمی نقش مهمی در تنظیم خواص الکتروفیزیولوژیک نورون‌ها ایفا می‌نمایند. آنها الگو و فرکانس شلیک در نورون‌ها را تنظیم نموده و از این طریق در کد نمودن سیگنال‌ها در سیستم‌های عصبی، حسی و حرکتی نقش دارند (۵, ۶). فعالیت کانال‌های پتاسیمی همچنین نقش مهمی در مسیرهای سیگنالینگ که منجر به تکثیر و تمایز سلول‌ها می‌شوند ایفا می‌نمایند. نشان داده شده است که مهار کانال‌های پتاسیمی به وسیله عوامل فارماکولوژیک تکثیر سلولی را در سلول‌های لنفوسیت طبیعی انسانی، سلول‌های ملانوما انسانی، سلول‌های سرطانی ریه و پروستات مهار می‌نماید (۷, ۸). از طرف دیگر نشان داده شده است که فعالیت آنزیم‌ها، نوکلئازها و کاسپازها که سیگنال‌های مرگ را هدایت و تقویت

می نمایند و از این طریق سبب آپوپتوزیس می شوند، وابسته به یون پتاسیم می باشند. ورمز Kv2.1 کانال های

پتاسیم مسئول بیان آپوپتوز در نورون های قشری در شرایط آزمایشگاهی است

کانال های پتاسیمی، پروتئین های اکتامری با دو زیر واحد مختلف هستند. این کانال ها هم در غشای سلول و

هم در غشای میتوکندری وجود داشته و نقش مهمی در ثبات حالت متابولیک سلول ها دارد (۹).

کاهش حجم سلول و فعال شدن کاسپاز یکی از ویژگی های اساسی آپوپتوز است. مطالعات جدید نشان

می دهند که تغییراتی در جریانات یونی به ویژه پتاسیم نقشی اساسی در پیشرفت آپوپتوز دارد. در سلول های

ایمنی و عصبی در حال آپوپتوز، میزان (K+) داخل سلولی به میزان قابل ملاحظه ای کاهش می یابد که باعث

فعال شدن کاسپاز ۳ و ایجاد آپوپتوز می گردد (۱۰).

در نورون های قشری موش، جریان پتاسیمی حساس به TEA شناسایی شده است که مسئول آپوپتوزیس

نورونی می باشد (۱۱).

کانال های پتاسیمی در عملکرد نورون ها در عقده های قاعده ای نقش مهمی ایفا می نمایند. نشان داده شده

است که جریان پتاسیمی نوع A در نورون های هسته جسم سیاه فعال بوده و مهار آن سبب افزایش شلیک

انفجاری در این نورون ها می گردد (۱۲).

۴-آمینوپیریدین (4-AP) یک ترکیب آلی می باشد که طیف بزرگی از کانال های پتاسیمی به ویژه کانال های

پتاسیمی غیرفعال شونده سریع، که جریان پتاسیمی نوع A را میانجی می نمایند مهار می نماید (۱۳). از طریق

مهار این کانال ها، 4-AP تحریک پذیری نورون ها را افزایش داده و سبب افزایش شلیک پتانسیل عمل در

آن ها می شود، نورون های خاموش را فعال می نماید و در برخی نورون ها الگوی شلیک را از مد تونیک به

شلیک انفجاری تبدیل می نماید (۱۴، ۱۵). شلیک انفجاری خروجی نورون ها را با فرکانس بالا برای مدت

کوتاه سبب گردیده و اثرات قویتری بر سلول های هدف نورون اعمال می نماید. به عنوان مثال کاربرد این

دارو بر نورون‌های پورکنژ مخچه، نورون‌های خاموش را فعال کرده و فعالیت دیگر نورون‌ها را به شدت افزایش می‌دهد (۱۶، ۱۷). در همین ارتباط نشان داده شده است که این دارو اختلالات نورولوژیک ناشی از نقص در فعالیت سلول‌های پورکنژ مخچه مانند آتاکسیا و نیستاگموس را بهبود می‌بخشد (۱۸-۲۰). 4-AP همچنین هدایت پتانسیل‌های عمل را در آکسون‌های آسیب‌دیده بهبود می‌بخشد و کاربرد آن سبب کاهش و تخفیف علائم بیماری مولتیپل اسکلروزیس می‌گردد (۲۱) همچنین گزارش‌هایی از اثرات مثبت این دارو در درمان بیماری آلزایمر وجود دارد (۲۲، ۲۳). 4-AP همچنین دارای برخی اثرات حفاظت نورونی می‌باشد. این دارو نورون‌ها را در برابر مرگ نورونی القاء شده توسط کاینات محافظت می‌نماید (۲۴).

مطالعات اندکی بر روی ارتباط بیماری پارکینسون با کانال‌های پتاسیمی انجام شده است. برخی مطالعات بیان می‌نمایند که اختلال در عملکرد کانال‌های پتاسیمی در عقده‌های قاعده‌ای ممکن است در پاتوژنیز بیماری پارکینسون نقش داشته باشد (۲۵). در تحقیقی که صورت گرفته مشخص گردیده که 4-AP دارای اثرات قابل توجهی در درمان بیماری پارکینسون در مدل حیوانی 6-OHDA می‌باشند (۲۶). از این رو در این تحقیق با توجه به مطالب گفته شده اثرات این دارو در پیشگیری از ایجاد بیماری پارکینسون القاء شده با سم 6-OHDA مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۲-۱- کلیات

۱-۲-۱- بیماری پارکینسون

بیماری پارکینسون یک بیماری نورودژنراتیو و پیشرونده می‌باشد که با اختلالات حرکتی و ناتوان کننده متعدد شامل برادی‌کنیز (آهستگی حرکات)، سفت‌شدگی عضلات، لرزش در هنگام استراحت و عدم تعادل وضعیتی همراه است.

مشخصه بارز بیماری از نظر پاتولوژی دژنراسیون آهسته و تدریجی نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه می‌باشد که منجر به کاهش سطح دوپامین، در استریاتوم (هسته‌های دم‌دار و پوتامن) می‌گردد (۲۷-۲۹).

۱-۱-۲-۱- اتیولوژی

۱-۱-۱-۲-۱- ایدئوپاتیک شایعترین نوع پارکینسونیسم علت مشخصی ندارد. این نوع ایدئوپاتیک بیماری پارکینسون یا فلج آژیتان نامیده می‌شود.

۱-۱-۲-۱-۲-۱- انسفالیت لتارژیک در نیمه نخست قرن بیستم پارکینسونیسم اغلب به دنبال انسفالیت وناکونومو ایجاد می‌گشت. از آنجایی که این عفونت دیگر مشاهده نمی‌شود موارد پارکینسونیسم به دنبال انسفالیت به صورت فزاینده‌ای نادر گشته است.

۱-۱-۲-۱-۳-۱- داروها: بسیاری از داروها مانند فنوتیازین‌ها، بوتیروفنون‌ها، متوکلوپرامید، رزپین و تترابنازین ممکن است سبب سندرم پارکینسونیسمی برگشت پذیر شوند.

۱-۱-۲-۱-۴-۱- سمومی مانند غبار منگنز یادی سولفیدکربن ممکن است سبب پارکینسونیسم شوند. پارکینسونیسم از عوارض مسمومیت شدید با مونوکسیدکربن یا استنشاق غبار ناشی از جوشکاری است.

بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داده که قرار گرفتن در معرض حشره‌کش‌ها نیز سبب بروز پارکینسونیسم می‌شود.

۱-۲-۱-۱-۵-MPTP: (۱-متیل-۴-فنیل-۲-و ۵-و ۶-تتراهیدروپیریدین) نوعی پارکینسونیسم دارویی در بیمارانی که ترکیبی مشابه مپریدین به نام MPTP ساخته و مصرف نموده‌اند گزارش شده است. این ماده به ترکیبی سمی متابولیزه می‌شود که منحصراً نورون‌های حاوی دوپامین ماده سیاه و نورونهای آدرنژیک لوکوس سرلئوس را تخریب ساخته، سبب پارکینسونیسم شدید در انسان‌ها می‌شود. ایجاد تغییرات نوروشیمیایی، پاتولوژیک و مشخصه‌های بالینی بیماری پارکینسون توسط این ماده امکان ایجاد بیماری ایدیوپاتیک توسط نوعی سم محیطی را مطرح ساخته است. پارکینسونیسم ناشی از MPTP ممکن است نمونه‌ای را فراهم سازد که در تولید داروهای جدید جهت درمان این بیماری مورد استفاده قرار گیرد

۱-۲-۱-۱-۶- پارکینسونیسم به همراه دیگر اختلالات نورولوژیک

۱-۲-۱-۱-۷- پارکینسونیسم ارثی پارکینسونیسم به ندرت ارثی است. بیماری در برخی موارد با توارث اتوزومال غالب ناشی از موتاسیون در ژن a-سینوکلئین (۴q۲۱) است. موتاسیون در ژن پارکین (6q25.2q27) عامل عمده پارکینسون ارثی با شروع زودرس و توارث اتوزومال مغلوب و نیز بیماری پارکینسون تک‌گیر با شروع در جوانی است انواع مختلفی از جابه‌جایی اکزونها و موتاسیون‌های نقطه‌ای در این بیماران یافت شده است (۳۰-۳۲).

۱-۲-۱-۲- پاتولوژی

در پارکینسونیسم ایدیوپاتیک بررسی پاتولوژیک نشان دهنده از بین رفتن سلول‌های پیگمانته در ماده سیاه و دیگر مراکز ساقه مغز، از بین رفتن سلول‌های گلوبوس پالیدوس و پوتامن و وجود گرانول‌های انکلوزیونی داخل نورونی ائوزینوفیلی (اجسام‌لوی) حاوی پروتئین a-سینوکلئین در

هسته‌های قاعده‌ای، ساقه مغز و نخاع و گانگلیون‌های سمپاتیک است. این اجسام انکلوژیونی در موارد پارکینسونیسم به دنبال انسفالیت مشاهده نمی‌شوند. در مقابل دژنراسیون غیراختصاصی نوروفیبرلر در برخی ساختمان‌های دیانسفال و نیز تغییرات ماده سیاه مشاهده می‌شود (۳۳).

۱-۲-۱-۳- پاتوژنز

دوپامین و استیل‌کولین در کورپوس استریاتوم موجود بوده و به عنوان واسطه‌های شیمیایی عمل می‌کنند. چنین به نظر می‌رسد که در پارکینسونیسم ایدیوپاتیک به علت کاهش دوپامین در سیستم ترشح کننده دوپامین نیگرواستریاتال تعادل طبیعی بین این دو واسطه شیمیایی که دارای اعمال متضاد هستند مختل می‌شود. واسطه‌های شیمیایی دیگر مانند نوراپی نفرین نیز در مغز مبتلایان به پارکینسونیسم کاهش می‌یابند اما اهمیت بالینی این کاهش مشخص نیست. به هم خوردن تعادل مهار و تحریکی در درون هسته‌های قاعده‌ای و ارتباط مستقیم و غیرمستقیم آن عامل بروز اختلالات حرکتی مبتلایان به پارکینسونیسم دانسته شده است.

۱-۲-۱-۳-۱- لرزه پارکینسونیسم با فرکانس ۴ تا ۶ هرتز مشخصاً در حالت استراحت بارزتر است. لرزه در نتیجه فشارهای عاطفی تشدید شده و اغلب در حین فعالیت اداری کاهش می‌یابد. لرزه معمولاً از دست یا پا شروع می‌شود و به شکل اکستانسیون-فلکسیون منظم انگشتان یا دست یا پا و با پروناسیون-سوپیناسیون منظم ساعد بروز می‌نماید. لرزه در بسیاری موارد صورت را در ناحیه دهان گرفتار می‌سازد. لرزه در نهایت هرچهار اندام را درگیر خواهد ساخت اما محدود ماندن لرزه در یک یا دو اندام یک سمت بدن برای ماه‌ها تا سال‌ها پیش از منتشر شدن شایع است. در برخی بیماران لرزه هیچ‌گاه علامت بارزی نخواهد داشت.

۱-۲-۱-۳-۲- رژیديته يا افزايش تون- يعنى افزايش مقاومت در مقابل حرکات غيرفعال، از مشخصات باليني پارکينسونيسم است. اختلال تون عامل وضعيت خميده بسيارى از مبتلايان به پارکينسونيسم مى باشد. مقاومت مشخصاً در تمام طول حرکت در يك مفصل خاص ثابت باقى مى ماند و عضلات آگونيست و آنتاگونيست به يك ميزان درگير مى شوند که اين امر برخلاف اسپاسميته است که در آن افزايش تون در شروع حرکات حداکثر بوده (پديده چاقوى ضامن دار) در برخى عضلات بيش از عضلات ديگر مى باشد. رژیديته ناشى از پارکينسونيسم در برخى موارد به سبب انقطاع هاى چرخ دهنده مانند در حرکات غيرفعال با عنوان رژیديته چرخ دهنده اى توصيف مى شود که علت آن تا حدودى ناشى از وجود لرزه است.

۱-۲-۱-۳-۳- هيپوکينزى ناتوان کننده ترين تظاهر بيمارى هيپوکينزى است (که گاه برادى کينزى يا آکينزى نيز خوانده مى شود). است که در آن حرکات ارادى آهسته شده، حرکات خودکار مانند نوسان دست ها هنگام راه رفتن، کاهش مى يابد. صورت بيمار نسبتاً بدون حرکت است (صورت ماسک مانند)، شيارهاى پلک گشاد شده و پلک زدن کاهش مى يابد و حالت صورت ثابت باقى مى ماند، لبخند به آرامى ايجاد مى شود و به آرامى از بين مى رود. بلندى صدا کاهش مى يابد (هيپوفونى) و تنظيم آن دچار اختلال مى شود. حرکات ظريف يا حرکات متناوب سريع مختل مى شوند اما قدرت در صورتى که بيمار وقت کافى داده شود کاهش نيافته است، دست خط ريز، لرزان و ناخوانا مى شود.

۱-۲-۱-۳-۴- راه رفتن و قامت غيرطبيعى بلند شدن از تخت يا مبل مختل مى شود و بيمار هنگام ايستادن، قامتى خميده دارد. شروع راه رفتن مشکل است به طورى که بيمار در حال درجا راه رفتن و پيش از امکان حرکت به جلو بيشتر و بيشتر به جلو خم مى شود. راه رفتن با قدم هاى کوچک و با کشيدن پاها صورت مى گيرد و نوسان طبيعى دست ها به هنگام راه رفتن وجود ندارد. دور زدن نامتعادل است و ايستادن نيز ممکن است مشکل باشد. در موارد پيشرفته بيمار جهت جلوگيرى از افتادن مرتباً به سرعت راه رفتن خود مى افزايد زيرا در نتيجه قامت غير طبيعى مرکز ثقل تغيير يافته است.

۱-۲-۱-۳-۵- دیگر تظاهرات بالینی بلغار و کلونوس خفیف (لرزش پلک‌های بسته) شایع است و در مواردی بلغار و اسپاسم (بسته شدن غیرارادی پلک‌ها) مشاهده می‌شود. آب دهان بیمار احتمالاً به علت اختلال بلع ممکن است سرازیر شود. مشخصاً تغییری در رفلکس‌های وتری مشاهده نمی‌شود و پاسخ کف پای فلکسور است. زدن ضربات متوالی به ریشه بینی (دو ضربه در ثانیه) سبب پلک زدن مداوم بیمار می‌شود (نشانه میرسون). حال آنکه در افراد طبیعی پلک زدن پس از چند ضربه متوقف می‌شود. اختلال شناختی ممکن است رخ دهد اما معمولاً خفیف و دیررس می‌باشد. افسردگی و توهمات بینایی شایع است (۲۸، ۳۰).

۱-۲-۱-۴- درمان

پارکینسونیسم در مراحل اولیه به درمان دارویی نیازی ندارد اما ماهیت بیماری و نیز در دسترس بودن درمان طبی در صورت تشدید علائم باید برای بیمار توضیح داده شود و بیمار باید تشویق به ارائه فعالیت شود. درمان در صورت لزوم جهت برقرار ساختن تعادل دوپامین-استیل‌کولین در استریاتوم توسط مهار اثرات استیل‌کولین با داروهای آنتی‌کولینرژیک یا تقویت اثرات دوپامین صورت می‌گیرد.

۱-۲-۱-۴-۱- داروهای آنتی‌کولینرژیک: داروهای آنتی‌کولینرژیک موسکاربینی در درمان لرزه و رژی‌دیتیه موثرتر از هیپوکینزی هستند اما به طور کلی تأثیر کمتر از داروهای تقویت‌کننده دوپامین دارند. از میان شایع‌ترین داروهای مصرفی، تری‌هگزی فنیدیل و بنزوتروپین را می‌توان نام برد.

۱-۲-۱-۴-۲- آمانتادین: از آمانتادین جهت درمان پارکینسونیسم خفیف به تنهایی یا به همراه یک داروی آنتی‌کولینرژیک می‌توان استفاده کرد. این دارو باعث بهبود تمام تظاهرات پارکینسونیسم می‌شود.

۱-۲-۱-۴-۳- لودودوپا: لودودوپا در بدن به دوپامین تبدیل می‌شود. تمامی علایم پارکینسون را بهبود می‌بخشد و برخلاف داروهای آنتی‌کولینرژیک به خصوص در درمان هیپوکینزی مؤثر است. مصرف

لوودوپا در مبتلایان به گلوکوم زاویه بسته و یا بیماریهای سایکوتیک ممنوع است. همچنین مصرف آن در مبتلایان به زخم پپتیک و یا ملانوم بدخیم، باید با احتیاط صورت گیرد.

۱-۲-۱-۴-۴- آگونیستهای دوپامین: آگونیستهای قدیمی دوپامین از مشتقات ارگوت هستند. برموکریپتین گیرنده‌های D₂ دوپامین را تحریک می‌سازد اثرات این دارو در بهبود علائم پارکینسون احتمالاً اندکی کمتر از لوودوپا می‌باشد اما به میزان کمتری باعث دیس‌کینزی می‌شود.

۱-۲-۱-۴-۵- سلجیلین: مهارکننده مونوآمین اکسیداز نوع B است، و از جمله داروهای ضد پارکینسونی ضعیف می‌باشد که تا حدی تاثیرات داروهای لوودوپا را شدت می‌بخشد. بهتر است این دارو در اوایل بیماری مصرف شود و در این مرحله مفیدتر است، چرا که به مدت یک یا دو سال اکثر نشانه‌های بیماری را تحت کنترل درمی‌آورد. گزارش‌هایی مبنی بر اینکه این دارو تاثیر حفاظتی دارد و روند پیشرفت بیماری را کند می‌نماید، متأسفانه نادرست از آب درآمد.

۱-۲-۱-۴-۶- جراحی: یکی از مهمترین استراتژی‌های درمانی پیوند بافت‌های دپامینرژیک می‌باشد. معکوس‌شدن، نارسایی‌های حرکتی و بیوشیمیایی در مدل‌های حیوانی بیماری پارکینسون بوسیله پیوند نشان داده شده است. عمومی‌ترین روش در پیوند قرار دادن سلول‌های اکتوپیک سوسپان شده از بافت‌های VM جنینی در کورپوس استریاتوم بدون عصب می‌باشد. این می‌تواند بسیاری از اثرات رفتاری آسیب را کاهش داده و یا حتی معکوس نماید. با وجود این هیچکدام از استراتژی‌های پیوند که تا به امروز آزموده شده است منجر به بازسازی کامل مسیر نیکرواستریاتال نشده است.

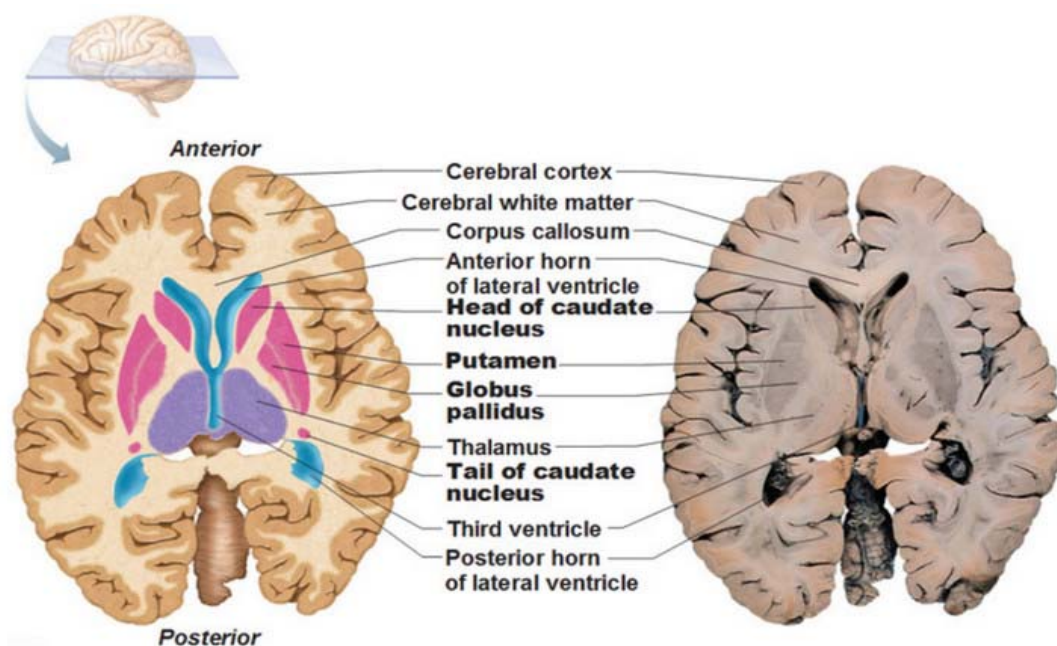
۱-۲-۱-۴-۷- تحریک عمقی مغز: تحریک الکتریکی تالاموس با فرکانس بالا در بهبود لرزه پارکینسون مفید است، این روش در درمان تمام عوارض پارکینسونیسم مفید است.

۱-۲-۱-۴-۸- ژن درمانی: علاوه بر داروهای جدید، روش‌های درمانی نوینی نیز ابداع شده است. ژن درمانی قابلیت چشمگیری در درمان بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی دارد. وارد کردن ژن‌های کارآمد به

مغز بیماران مبتلا به پارکینسون روش مفیدی است تا این ژن‌های سالم جایگزین ژن‌های معیوب شوند. هدف از انجام این کار وارد کردن پروتئینی است که از آسیب سلولی ممانعت کرده و یا عملکرد سلول آسیب دیده را مجدداً برقرار نموده و یا امکان انتقال فیزیولوژیکی را در ناقلین عصبی ناقص فراهم آورد (۲۸، ۳۴).

۱-۲-۲- ساختمان و عملکرد عقده‌های قاعده‌ای

عقده‌های قاعده‌ای یک گروه به هم پیوسته از هسته‌های عمقی مغز می‌باشند. از نظر فیزیولوژیک این هسته‌ها شامل ۵ قسمت هسته کودت، پوتامن و گلوبوس پالیدوس در مغز جلوئی، هسته ساب‌تالاموس در دیانسفال، و ماده سیاه (substantia nigra) در مزانسفال می‌شوند. به مجموع هسته کودت و پوتامن، استریاتوم می‌گویند (۳۵-۳۷).



شکل ۱-۱: اجزای عقده‌های قاعده‌ای در مغز را نشان می‌دهد.

استریاتوم بعنوان بخشی از تلنسفال وسیعترین و اصلی‌ترین جز عقده‌های قاعده‌ای محسوب می‌گردد. این هسته‌ها از لحاظ فیزیولوژی بعنوان یک واحد تک عمل نموده اما از نظر آناتومیکی توسط کپسول داخلی از یکدیگر جدا می‌گردند. و از دو بخش اصلی یعنی استریاتوم پشتی و استریاتوم شکمی تشکیل شده است. این دو بخش از نظر ساختمان سلولی، مشخصات نوروشیمیایی و ارتباط آوران شباهت زیادی با هم داشته ولی از نظر توپوگرافی و ابرانها و نوع اطلاعاتی که پردازش می‌کند متفاوت از هم می‌باشند. استریاتوم پشتی، بخش اصلی نئواستریاتوم به حساب می‌آید به این علت که مرز مشخصی بین دو نئواستریاتوم نمی‌توان در نظر گرفت. لذا استریاتوم شکمی را امتداد شکمی استریاتوم پشتی در نظر می‌گیرند (۳۸).

استریاتوم دریافت‌کننده اصلی آوران‌ها به عقده‌های قاعده‌ای می‌باشد. این ورودی‌ها شامل فیبرهای گلوتاماتینرژیک که از تمامی نواحی قشر مغز منشا می‌گیرند، فیبرهای دوپامینرژیک از بخش متراکم جسم سیاه و فیبرهایی از تالاموس می‌باشند. خروجی‌ها از عقده‌های قاعده‌ای (بخش مشبک جسم سیاه و بخش داخلی گلوبوس پالیدوس) منشا می‌گیرند. این فیبرها بطور تونیک هسته‌های هدفشان را در تالاموس و ساقه مغز مهار می‌نمایند. استریاتوم از طریق مسیرهای مستقیم و غیر مستقیم هسته‌های تالاموسی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. هر دو این مسیرها از پوتامن منشا می‌گیرند. مسیر مستقیم در بخش داخلی گلوبوس پالیدوس و بخش مشبک ماده سیاه ختم می‌شود. این مسیر از همان نورون‌هایی منشا می‌گیرد که ورودی‌های قشری را دریافت می‌دارند. تحریک این مسیر، مهار را از روی هسته‌های تالاموسی که توسط بخش داخلی گلوبوس پالیدوس و ماده سیاه اعمال می‌شود برمی‌دارد.

مسیر غیرمستقیم، بخش خارجی گلوبوس پالیدوس را درگیر می‌نماید. این بخش هسته ساب‌تالاموس را مهار می‌نماید. با مهار بخش خارجی گلوبوس توسط استریاتوم، هسته ساب‌تالاموس فعال شده و

فعالیت بخش داخلی گلوبوس پالیدوس را افزایش می‌دهد که سبب مهار بیشتر هسته‌های تالاموسی می‌شود.

بررسی این مسیرها نشان می‌دهد که در جریان یک حرکت، مسیر مستقیم فیدبک مثبت اعمال کرده و با افزایش فعالیت تالاموس و قشر، حرکت را تسهیل می‌نماید. از طرف دیگر مسیر غیرمستقیم فیدبک منفی اعمال کرده و مهار حرکت را سبب می‌شود. نورون‌هایی که منشأ مسیر مستقیم می‌باشند دارای گیرنده D_1 برای دوپامین می‌باشند. این گیرنده تحریکی می‌باشد. آن‌هایی که مسیر غیرمستقیم را تشکیل می‌دهند، گیرنده D_2 داشته که مهاری می‌باشد. بر این اساس، فیبرهای دوپامینرژیک از بخش متراکم ماده سیاه که در استریاتوم ختم می‌شوند، انتقال در مسیر مستقیم را تسهیل می‌نمایند و انتقال در مسیر غیرمستقیم را مهار می‌نمایند. بیماری‌هایی که بازال گانگلیا را درگیر می‌نمایند موجب فعال شدن و یا مهار بیش از حد یکی از این مسیرها می‌شوند. چنانچه تعادل به نفع مسیر مستقیم باشد، اختلالات هیپوکینتیک رخ می‌دهد و اگر تعادل به نفع مسیر غیرمستقیم باشد، اختلالات هیپوکینتیک ایجاد می‌شود. بیماری پارکینسون از جمله اختلالات هیپوکینتیک می‌باشد (۳۹، ۴۰).

نئواستریاتوم در موش صحرایی یک توده خاکستری رنگ و بزرگ بوده که عمقی‌ترین بخش نیمکره مغزی را اشغال می‌کند و در بافت تازه تهیه شده و در رنگ‌آمیزی نیسل تقریباً یکنواخت بنظر می‌آید.

۱-۲-۲-۲- جسم سیاه

جسم سیاه در بخش شکمی تگمنتوم مغز میانی قرار داشته و طول آن در جهت سری-دمی $2/5$ میلی‌متر و در جهت میانی-جانبی پهنای آن 3 میلی‌متر می‌باشد. حجم بخش متراکم جسم سیاه $0/3 \text{ mm}^3$ و محتوی $12000-10000$ نورون در هر طرف می‌باشد جسم سیاه در مهره‌داران پست به صورت بدوی و

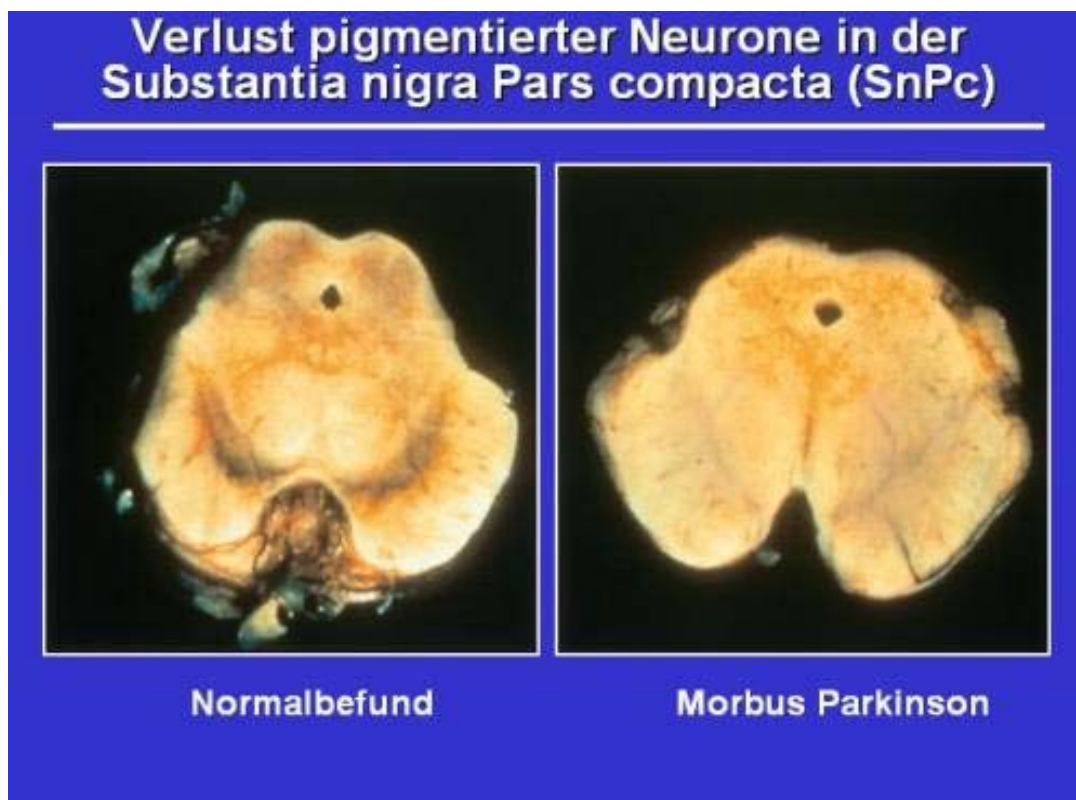
رشد نایافته است ولی بطور مشخص در پستانداران ظاهر می‌شود و در مغز انسان به بزرگترین اندازه خود می‌رسد (۴۱).

جسم‌سیاه اگر چه یک هسته از مزانسفال بوده ولی بدلیل ارتباطات غنی که با استریاتوم دارا می‌باشد بعنوان جزئی از عقده‌های قاعده‌ای محسوب می‌گردد. رنگ سیاه این قسمت بعلت رنگ‌دانه ملانین که از متابولیسم دوپامین تولید می‌شود و در نورون‌های بخش متراکم است می‌باشد و بخوبی با چشم غیر مسلح دیده می‌شود.

این هسته، ناحیه‌ای از مغز است که تحقیقات زیادی در رابطه با آن به انجام رسیده است و در بیماری عصبی پارکینسون نورون‌های دوپامینرژیک آن تحلیل می‌رود (۳۵).

جسم‌سیاه یک گروه یکنواخت از عناصر مرتبط از نظر نوروشیمیایی و عملکردی به حساب می‌آید. این هسته دارای یک بخش متراکم مجاور تگمنتوم با سلول‌های حاوی رنگدانه نوروملانین، یک بخش مشبک که مجاور پایک‌های مغزی است می‌باشد. امتداد جانبی بخش متراکم قسمت کوچکی بنام بخش جانبی می‌باشد. بخش متراکم جسم‌سیاه مرکب از یک صفحه از نورون‌های دوپامینرژیک می‌باشد که بصورت کلاهکی بر روی بخش مشبک قرار می‌گیرد بخش متراکم جسم‌سیاه محتوی نورون‌های دوپامینرژیک با اندازه متوسط و تراکم زیاد می‌باشد. اندازه جسم سلولی هر نورون حدوداً ۲۰-۱۱ میکرومتر بوده و دارای یک هسته خارج از مرکز می‌باشند. بخش جانبی کوچکترین قسمت جسم سیاه است و نورون‌های آن عمدتاً به اندازه متوسط و به اشکال گرد، دوکی و ستاره‌ای می‌باشند. بخش جانبی برخی از این نورون‌هایش دوپامینرژیک بوده و به آمیگدال و استریاتوم، فیبر ارسال می‌کنند، در حالیکه برخی دیگر غیر دوپامینرژیک بوده و به کولیکولوس تحتانی، فیبر می‌فرستند. نورون‌های بخش مشبک چند قطبی و گابائترژیک بوده و به

اشکال بیضوی، گرد و یا مثلثی یافت می‌شوند و شباهت بسیاری را با نورون‌های گلوبوس پالیدوس نشان می‌دهند (۴۲، ۴۳).



شکل ۱-۲: مقایسه جسم سیاه در یک فرد سالم با یک فرد مبتلا به پارکینسون

۱-۲-۳- گلوبوس پالیدوس

گلوبوس پالیدوس از دیانسفال مشتق شده، بین پوتامن و کپسول داخلی قرار دارد و از دو هسته مجزا خارجی و داخلی که به وسیله لایه نازکی از آکسون‌ها از یکدیگر جدا شده‌اند تشکیل شده است.

هر دو هسته حاوی تعداد کمی نورون‌های بزرگ با دندریت‌های طولانی می‌باشند. دوپامین آزاد شده از مسیر نیگرواستریاتال اثرات عملی مخالفی بر روی دو نوع جمعیت سلولی استریاتوپالیدال دارد به گونه ای که نورونهای پروجکت شده به بخش خارجی و داخلی GP را به ترتیب مهار و تحریک می‌کنند. هر دو قسمت گلوبوس پالیدوس ارتباط آوران و وبران مجزایی دارند. بخش داخلی گلوبوس پالیدوس (همراه با

قسمت مشبک جسم سیاه (CNR) به دلیل اینکه منشا اکثر فیبرهایی بوده که به قسمت‌های دیگر محور مغزی- نخاعی می‌روند بعنوان خروجی اصلی عقده‌های قاعده‌ای شناخته شده است. منشا اصلی آوران قسمت داخلی گلوبوس پالیدوس استریاتوم می‌باشد، و بدلیل اینکه بطور مستقیم فعالیت سلول‌های خروجی پالیدال داخلی را کنترل می‌کند مسیر مستقیم نام گرفته است. وبران قسمت داخلی پالیدوس گابارژیک هستند. قسمت داخلی گلوبوس پالیدوس نیز پروجکشن گابارژیک از استریاتوم دریافت داشته و بعلت اینکه به طور غیرمستقیم بر روی فعالیت سلولهای گلوبوس داخلی از طریق یک ارتباط با هسته ساب‌تالاموس اثر می‌گذارد، منشا مسیر غیرمستقیم می‌باشد الیاف آوران آن شامل الیاف Striatopallidal می‌باشند این الیاف از هسته‌های دم‌دار و پوتامن به سمت گلوبوس پالیدوس می‌روند این الیاف ماده GABA را به عنوان نوروترانسمیتر آزاد می‌نماید وبران‌ها شامل ۴ گروهند: الیافی که به هسته‌های تالاموس می‌رود، الیافی که به ساب تالاموس می‌رسد، الیافی که در بخش تحتانی تگمنتوم ساقه مغز خاتمه می‌یابند و الیاف pallidosubthalamic که به هسته‌های ساب‌تالامیک می‌روند (۳۶، ۴۴).

۱-۲-۳- نوروترانسمیترها

نوروترانسمیترها موادی هستند که در ترمینال‌های پیش‌سیناپسی سنتز و نگهداری می‌شوند و در برابر تحریک مناسب آزاد شده و از شکاف سیناپسی عبور کرده و با نقاط گیرنده اختصاصی در سلول بعد از سیناپس باند می‌شوند. مهمترین نوروترانسمیترها از نظر عمل عقده‌های قاعده‌ای عبارتند از گلوتامات که سبب فعال شدن پروژکسیون‌های تحریکی کورتیکواستریاتال می‌شود، استیل‌کولین، دوپامین، گاما آمینوبوتیریک اسید و سووتونین، نوراپی نفرین نیز به مقدار کم موجود است ولی عمل آن به درستی روشن نیست. عقده‌های قاعده‌ای دارای مواد فعال بیولوژیک دیگر مانند ماده P، انکفالین، کوله‌سیستوکینین و سوماتوستاتین نیز می‌باشد که ممکن است اثرات نوروترانسمیترها را تشدید و یا تخفیف دهند.

استیل کولین یک نوروترانسمیتر می باشد که در گانگولین های اتونومیک و عقده های قاعده ای نیز یافت می شود. بیشترین غلظت Ach و کولین استیل از و استیل کولین استراز (که به ترتیب این دو آنزیم در سنتز و تخریب Ach شرکت می کنند) در استریاتوم یافت می شود. استیل کولین توسط نورون های نئواستریاتال کوچک (گلژی تیپ II) سنتز و آزاد می شود که روی آنها اثر تحریکی دارد. به نظر می رسد که احتمالاً علت اثر آلکالوئیدهای بلادونا که سال ها برای درمان پارکینسون به کار می رفت و می رود معمولاً توان آنها در آنتاگونیست کردن Ach بصورت مرکزی باشد (۲۸).

از کاتکولامین ها دوپامین، نوراپی نفرین و اپی نفرین قابل ذکرند، که دوپامین از اهمیت بیشتری برخوردار می باشد. در مغز دوپامین توسط آنزیم های مونوآمین اکسیداز و کاتکول-اُمتیل ترانسفراز متابولیزه می شود. مواد نهایی عبارتست از همووانیلیک اسید و دی هیدروکسی فنیل اسید می باشد

دوپامین علاوه بر اینکه precursor نوراپی نفرین می باشد اثرات دیگری نیز در مغز دارد. نواحی غنی از دوپامین عبارتند از:

- ۱- جسم سیاه که در آنجا دوپامین توسط اجسام سلول های عصبی pars compact سنتز می شود.
 - ۲- استریاتوم که در آنجا در پایانه های سیناپسی الیاف نیگرا قرار دارد.
- تحریک جسم سیاه سبب آزاد شدن دوپامین در استریاتوم می شود که آن هم اثر وقفه ای روی نورون های نئواستریاتال دارد. الیاف استریاتونیگرا در pars reticulate دارای گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز می باشند. که این آنزیم در سنتز GABA مصرف می شود. GABA به مقدار زیاد در جسم سیاه ، استریاتوم و گلوبوس پالیدوس یافت می شود که نقش وقفه ای را به عهده دارد. راه های عصبی اختصاصی فعالیت این ترانسمیتر، هنوز مشخص نیست (۲۸).

۱-۲-۴- مدل تجربی بیماری پارکینسون

بیماری پارکینسون (PD) یکی از بیماری‌های انسانی بحساب می‌آید که فرم خودبخودی آن در حیوانات ظاهر نمی‌گردد با این وجود برخی علائم مشخصه بیماری را می‌توان با تجویز عوامل فارماکولوژی (مهارکننده آنزیم تیزوزین هیدروکسیداز) نظیر رزپین (Reserpine)، آلفامتیل - پ - تیروزین (α -methyl- p- tyrosin)، و همچنین عوامل نوروتوکسین نظیر مت‌آمفتامین (Methamphetamine)، ۶- هیدوکسی‌دوپامین (6-OHDA) (6-Hydroxydopamine) و ۱-متیل-۴-فنیل-۶،۳،۲،۱-تتراهیدروپیریدین (MPTP) (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydro pyridine) بوجود آورد (۴۵، ۴۶).

۱-۲-۵- مدل‌های حیوانی آزمایشگاهی بیماری پارکینسون :

۱-۲-۵-۱- اختلالات عملکردی القا شده توسط عوامل فارماکولوژی در نوروترانسمیتر دوپامین

۱-۲-۵-۲- مدل رزپین: carlsson و همکارانش (۱۹۵۷) این موضوع را مطرح ساختند که کاهش دوپامین در استریاتوم مسئول علائم حرکتی بیماری پارکینسون است. آنها نشان دادند که حالتی از آکینزیا می‌تواند توسط جذب سیستمیک رزپین در رت‌ها ایجاد شود و نیز این میزان از بیماری می‌تواند توسط L-DOPA درمان شود. در رت‌ها رزپین باعث اختلالات حرکتی همچون آکینزیا هیپوکینیزیا و یا کاتالپسی همراه با ترمور شود. مکانیسم دقیق اثرات فاماکولوژیک رزپین هنوز به طور کامل درک نشده است. اما ثابت شده است که در دوزهای بالا ذخایر ویزیکولی داخل نورونی توسط مگنزیوم و مکانیسم‌های وابسته به ATP تحت تاثیر قرار می‌گیرند و نیز ذخایر دوپامین و سایر نوروترانسمیترهایی چون آدرنالین نورآدرنالین هیستامین و سروتونین کاهش می‌یابد. به علاوه بازجذب پس‌سیناپسی هم ممکن است به حداقل زمان ممکن برسد. در گذشته از محدودیت‌های حرکتی ایجاد شده توسط رزپین بر روی جوندگان به طور گسترده‌ای در بررسی درمان‌های ضد پارکینسونی استفاده می‌شد. و طی این بررسی‌ها L-DOPA آمفتامین و

مشتقات آن آگونیست‌های گیرنده دوپامین و آنتاگونیست‌های NMA موثر واقع شدند. اما امروزه به دلیل اینکه رزپین باعث آزادسازی انواع گوناگون نوروترنسمیترها می‌شود این روش به ندرت مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش دیگری که توسط گروه Carlsson مورد استفاده قرار گرفت مدل ایجاد آکینزیا برای بررسی روش‌های درمانی بود، حیوانات آزمایشگاهی که در این روش مورد استفاده قرار گرفتند موش‌هایی بودند که از ۱۸ ساعت قبل 10mg/kg رزپین به صورت داخل صفاقی به آنها تزریق شد تا فعالیت‌های حرکتی آنها بررسی شود و نیز برای مشاهده‌ی اثرات بالقوه ۲ ساعت قبل به این حیوانات a متیل p تیروزین (500mg/kg) (تزریق شد. در واقع این ماده از سنتز دوپامین جلوگیری می‌کند فعالیت حرکتی این حیوانات توسط یک دستگاه اندازه‌گیری الکترونیک که میانگین فعالیت‌های حیوانات را در دوره‌ی زمانی مشخص ثبت می‌نمود اندازه‌گیری می‌شد (۴۷).

۱-۲-۵-۳- مدل کاتالپسی القا شده توسط داروهای آرام‌بخش

آرام‌بخش‌هایی نظیر هالوپریدول به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌ی D2 دوپامین اثراتی را ایجاد می‌کنند که مشابه علائم ایجاد شده متعاقب تزریق رزپین است. در رت‌ها کاتالپسی به این معناست که حیوان نمی‌تواند اندام‌هایش را به طور صحیح و دقیق و سریع در یک موقعیت غیر معمول قرار دهد این فرایند به راحتی طی یک سری تست‌هایی در رت‌ها بررسی می‌شود بررسی‌های فارماکولوژیک اخیر نشان داده‌اند که کاتالپسی ایجاد شده توسط هالوپریدول 0/5mg/kg می‌تواند با آنتاگونیست‌های گیرنده‌ی NMDA مقابله کند به عنوان مثال آماتادین و MK801 باعث مهار وابسته به دوز کاتالپسی ایجاد شده توسط هالوپریدول می‌شود. در حالیکه ممانتین با دوز 10mg/kg به میزان کمتری موثر است. طی مطالعات عمقی و بررسی‌های درجات کاتالپسی القا شده توسط هالوپریدول و مورفین نتیجه می‌شود که کاتالپسی حالت پیچیده‌ای از نقایص حرکتی می‌باشد که توسط تست‌های رفتاری کلاسیک قابل بررسی است. اخیراً کاتالپسی توسط کاهش دوپامین به صورت آزمایشگاهی قابل طراحی می‌باشد و شامل آکینزیا سفتی عضلانی (ریگور) و

لرزش اندام‌ها می‌باشد. با ایجاد این حالت نورون‌هایی از مغز مسئول شروع حرکات ارادی هستند غیر فعال بوده ولی بخش‌هایی از مغز که در کنترل رفلکس‌های وضعیتی و حفظ تعادل بدن نقش دارند به صورت طبیعی عمل می‌کنند. در این حیوانات کاتالپتیک، اگرچه شروع حرکت مختل شده است اما با اعمال تحریکات خارجی قوی‌تری نظیر فشار دادن دم حیوان آب سرد یا صداهای بلند می‌توان حیوان را به سمت فعالیت سوق داد (۴۸).

۱-۲-۵-۶- برادی‌کینزیا و آکینزیای القا شده توسط هالوپریدول

تزریق دوزهای پایین 0/15 mg/kg یا 0/3 هالوپریدول به رت‌ها می‌تواند منجر به حالات رفتاری مشابه علائم آکینزیا و برادی‌کینزیا بیماری پارکینسون شود.

Hauber (۱۹۹۰) جهت اندازه‌گیری اثر دوپامین در کنترل و شروع فعالیت حرکتی رت‌ها تکنیکی را ابداع کرد که در آن آغاز سریع فعالیت حرکتی در پاسخ به تحریک منجر به پاداش غذایی می‌شد. وسائل آزمایش شامل جعبه شروع یک مسیر و یک جعبه هدف بود، یک رت آموزش دیده در جعبه شروع قرار می‌گرفت و یک تحریک خروجی دروازه را مشخص می‌کند رت به این تحریک پاسخ داده شروع به حرکت و طی مسیر نموده تا به جعبه هدف رسیده و به جایزه یا غذا دست یابد. مدت زمان مابین شروع سیگنال و شروع فعالیت حرکتی توسط یک سوئیچ فتوالکتریک اندازه‌گیری می‌شود جذب سیستمیک هالوپریدول در دوزهای اشاره شده باعث وخیم‌تر شدن رفتارهای حرکتی نظیر تاخیر شروع حرکت، یا آکینزیا و شروع آهسته حرکت یا برادی‌کینزیا می‌شود (۴۸، ۴۹).

۱-۲-۵-۵- مدل متامفتامین

متامفتامین‌ها داروهای محرک روانی اعتیاد آوری هستند که فعالیت آنها به صورت اولیه توسط مکانیسم آزاد سازی دوپامین می‌باشد. در دوزهای بالا این داروی محرک روانی باعث فعالیت سمی در جوندگان می‌شود اما در انسان فاقد چنین خاصیتی است (۳۹).

۱-۲-۵-۶- مدل MPTP

دیگر مدل آزمایشگاهی بیماری پارکینسون مدل MPTP نامیده می‌شود. MPTP امروزه بسیار مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفته است. طی سال‌های ۱۹۷۹ الی ۱۹۸۲ مطالعاتی بر روی جوانان معتاد کالیفرنایی انجام شد. این افراد نوعی هروئین ترکیبی را به صورت تزریقی دریافت کردند و مشاهده شد که در آنها شیوع یک سندروم پارکینسونی جدی ایجاد شد. این بیماران تمام علائم پارکینسون را نشان داده و نسبت به درمان با L-DOPA به خوبی پاسخ دادند. آنالیز هروئین ترکیبی نشان داد که این ماده حاوی ۲/۹٪ MPTP است. قدرت این ماده در ایجاد سندروم پارکینسون قبلاً بر روی انواع مختلف حیوانات بررسی شده امروزه بررسی‌های بیوشیمیایی و هیستوشیمیایی نشان می‌دهند که این ماده باعث ایجاد سندروم پارکینسون در انسان می‌شود. در موش‌ها و پرایم‌های غیر انسانی این دارو قادر به ایجاد تغییرات پاتوبیوشیمیایی و هیستوپاتولوژی مشخصه بیماری پارکینسون است اما ترمور به عنوان یکی از علائم اصلی اغلب مشاهده نمی‌شود. اما یک مدل پیشرفته از پارکینسون را می‌توان در میمون‌ها توسط MPTP ایجاد کرد. بدین ترتیب می‌توان کاهش نورون‌های دوپامینرژیک را در VTA و کاهش نورون‌های نورآدرنرژیک را در لوکوس سرلئوس مشاهده کرد. این آسیب‌ها منجر به تغییرات نوروترانسمیترهای دوپامین و نورآدرنالین در مغز حیوانات شده اما نوروپپتیدها بدون تغییر باقی می‌مانند. توانایی MPTP برای ایجاد اثرات سمی در

حیوانات به تولید تتراهیدروایزوکوئینولین ها (N متیل سالسولینول) و B کربولین ها مربوط می شود. اگرچه تتراهیدروایزوکوئینولین و ۱-متیل مشتق از آن در هسته دم دار و لوب فرونتال مغز انسان بسیار کم می باشد، اما این میزان در فرد سالم و پارکینسونی تفاوتی ندارد. ذخایر کمتر ولی آشکاری از N متیل سالسولینول در CSF بیماران پارکینسونی که توسط L-DOPA درمان نشده اند در مقایسه با بیماران گروه کنترل مشاهده شده است (۳۹، ۵۰، ۵۱).

فاکتورهایی که عمل سمیت زایی MPTP را تحت تاثیر قرار می دهند:

- نوع و خانواده حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده

- تفاوت های فردی

- سن حیوانات

- تاثیر طراحی مدل آزمایشگاهی

۲-۷-۱-۷ مدل ۶ هیدروکسی دوپامین

فعالیت نوروتوکسیک ۶ هیدروکسی دوپامین (6-OHDA) ابتدا هنگام بررسی های دستگاه عصبی مرکزی مشخص شد. در این دستگاه 6-OHDA طی چندین ماه باعث کاهش نورآدرنالین و نیز باعث تخریب انتخابی پایانه های عصبی نورآدرنرژیک می گردد. جذب سیستمیک 6-OHDA قادر به عبور از سد خونی مغزی نمی باشد. هرچند تزریق مستقیم دوزهای پایین این سم به بطن طرفی (150mg) یا به دیگر ساختارهای مغزی (8mg) منجر به تخریب انتخابی نورون های کاتهکول آمین می شود. این ماده باعث کاهش دوپامین نورآدرنالین و آدرنالین در نواحی آسیب دیده مغزی می شود. در حالیکه ذخایر سایر نوروترانسمیترها (استیل کولین، سروتونین و گابا) بدون تغییر باقی می ماند. کاربرد مهارکننده های سیستم

انتقال نورآدرنالین با کیفیت بالا می‌تواند وسعت ناحیه آسیب دیده از نورون‌های دوپامینرژیک را محدود نماید. تزریق این سم به داخل دستجات فیبری دوپامینرژیک و یا به داخل جسم‌سیاه دژنراسیون و تخریب کامل نواحی A9 و A10 را سبب می‌شود که هیچگونه شباهتی با مراحل اولیه PD در انسان نشان نمی‌دهد. نوروتوکسین 6-OHDA بعلت شباهت زیادی که با سایر کاته‌کول‌آمین‌ها دارد بطور انتخابی توسط سیستم انتقال کاتکول‌آمین وارد سلول می‌شود (۴۱، ۵۱).

بدنبال تزریق 6-OHDA بداخل استریاتوم کاهش دراز مدت، پایدار و بارز تعداد نورون‌ها در جسم‌سیاه همان طرف رخ می‌دهد. (اثر رتروگراد) 6-OHDA توسط نورون‌های جسم‌سیاه همانند دوپامین شناخته شده و در سلول‌ها به صورت گرانولار ذخیره و سپس به سلول باند شده و با تحریک عصبی آزاد شده به عنوان یک نوروترانسمیتر کاذب عمل می‌کند. میزان بالای تجمع سیتوپلاسمی آن باعث تولید میزان بالایی از محصولات 6-OHDA مثل پراکسیدها، سوپراکسیدها و کوینون‌ها شده که این فراورده‌ها باعث تخریب نورونی می‌شوند. RER و غشای سلولی، هسته، میتوکندری اولین محل‌هایی هستند که توسط 6-OHDA آسیب می‌بیند. این سم در میتوکندری موجب عدم ایجاد فسفریلاسیون اکسیداتیو می‌شود. پس در CNS حیوانات پس از تزریق این سم تغییراتی را در هر دو نورون‌های دوپامینرژیک و مونوآمینرژیک رخ می‌دهد. این سم با ورودش به داخل سیتوپلاسم سمیت خود را آشکار کرده و سلول‌های مونوآمینرژیک را به صورت انتخابی تخریب می‌کند. مطالعات قبلی نشان می‌دهند که رت‌هایی که تزریق یکطرفه 6-OHDA به جسم‌سیاه داشته‌اند، یک سندروم حرکتی را نشان داده که در آن چرخش به سمت همان سمت آسیب دیده، دیده می‌شود. همچنین تحقیقات قبلی نشان می‌دهند که تزریق دوز متوسط 6-OHDA می‌تواند در عدم حضور آسیب‌های ساختاری تغییراتی را در مغز اعمال کند. ذخایر دوپامین به صورت اولیه پس از تزریق افزایش می‌یابد ولی سپس میزان آن پس از آسیب‌های متوالی به نورون‌های دوپامینرژیک کاهش یافته و تمام

نئواستریاتوم نقش مهمی در تنظیم اعمال حرکتی بدن به عهده دارد و یکی از آورانهای اصلی آن سیستم دوپامینرژیک نیگرواستریاتال می باشد که ۱۵-۱۰٪ پایانه های موجود در نئواستریاتوم را تشکیل داده و آسیب آن اثر بارزی را بر اعمال حرکتی بدن به جا می گذارد.

نتایج تحقیقات متعدد نشان می دهد که بروز عدم تعادل در فعالیت نورونی دوپامینرژیک بین دو طرف سبب بروز یک عدم تقارن در رفتار حرکتی حیوان مبتلا می شود. در موش صحرایی این عدم تقارن خود را به فرم چرخش حیوان به سمت با فعالیت دوپامینرژیکی کمتر نشان می دهد.

با تزریق یک طرفه 6-OHDA به داخل استریاتوم موش صحرایی، بخش اعظم نورون های دوپامینرژیک از بین رفته و در نتیجه کاهش سطح دوپامین در استریاتوم همان طرف ضایعه ایجاد می گردد. حیوانات با تخریب یک طرفه برای مدت زمان کوتاهی پس از جراحی یک عدم تقارن حرکتی خودبخودی (رفتار چرخشی به همان طرف) را نشان داده ولی به زودی این عدم تقارن محو شده و رفتار حیوان طبیعی به نظر می آید، مگر آنکه یک محرک فیزیکی به حیوان وارد گردد. به دنبال تجویز سیستمیک آگونیست های دوپامینرژیک و با توجه به ماهیت دارو، یک رفتار حرکتی چرخشی بارز در حیوان پدیدار می گردد که آن را می توان به طور کمی اندازه گیری نمود (۵۳).

با تخریب طرف چپ سیستم دوپامینرژیک نیگرواستریاتال، تراکم گیرنده های دوپامینرژیک واقع بر روی نورون های هدف استریاتال بر اثر بروز حالت تنظیم افزایشی بیشتر می شود. به دنبال آسیب ناشی از 6-OHDA تراکم گیرنده های نوع D2 افزایش یافته در حالی که تغییرات گیرنده نوع D1 به خوبی معلوم نیست. به همین دلیل با تجویز داروهای با اثر مستقیم و غیرانتخابی که مستقیماً بر روی گیرنده ها اعمال اثر می کنند، فعالیت حرکتی در سمت چپ نسبت به سمت راست بیشتر شده و در نتیجه حیوان به سمت مقابل در جهت عقربه های ساعت خواهد چرخید (۵۴).

۲-۷-۱-۷-۲ تغییرات رفتاری پس از تخریب دوطرفه: تزریقات استریوتاکسیک دو طرفه 6-OHDA به استریاتوم رت منجر به مرگ قسمت اعظم سلول‌های عصبی دوپامینرژیک در جسم سیاه و نیز کاهش دوپامین در استریاتوم می‌شود حیوانات دچار آکینزی‌آفازی و نانوشی (آدیپسی) و نهایتاً مرگ می‌شوند شدت کمتری از علائم ذکر شده را می‌توان در رت‌هایی مشاهده کرد که این سم توسط دستگاه استریوتاکسی به ناحیه MFB (بخش قدامی طرفی هیپوتالاموس) آنها تزریق شده است. تزریق به این ناحیه باعث کاهش نورآدرنالین از هیپوتالاموس و دوپامین از استریاتوم می‌گردد این هیپوکینزی ممکن است با L-DOPA یا سایر آگونیست‌های گیرنده دوپامین بهبود یابد اما توسط مواد آنتی‌کولینرژیک بهبود نمی‌یابد. اخیراً از تزریق‌های دوطرفه به ندرت استفاده می‌شود (۵۳).

۱-۲-۶- آپوپتوز

آپوپتوز اولین بار در سال ۱۹۷۲ میلادی توسط محققى به نام Kerr شناخته شد. این واژه ریشه یونانی دارد و به معنای افتادن برگ از درخت است. در مواردی که زنده ماندن یک سلول، موجودیت موجود زنده را به خطر بیندازد، سلول با مرگ برنامه‌ریزی شده، خودکشی می‌کند. زمانی که سلول تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی و یا حتی درونی، همانند اشعه‌های یونیزه کننده، داروهای سیتوتوکسیک (در درمان سرطان‌ها) هایپرترمیا، هورمون‌های گلوکوکوررتیکوئیدی و .. قرار می‌گیرد درونمایه آن از جمله DNA، دستخوش تغییراتی می‌شوند که در صورت ادامه حیات آن منجر به ناهنجاری‌هایی شدیدی از جمله سرطانی شدن سلول می‌شوند. عوامل دیگری نظیر برخی باکتری‌های بیماری‌زای داخل سلولی مانند سالمونلا، شیگلا، لیستریا، لژیونلا و ... نیز در هنگام عفونت‌زایی خود با تغییر، در برخی مسیرهای متابولیکی و بیوشیمیایی داخل سلولی می‌توانند، در هدایت سلول به سمت این نوع خاص از مرگ موثر باشند (۵۵).

مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، از طریق مسیرهای مختلفی، برانگیخته می‌شود، برخی از این مسیرها در اثر اتصال لیگاند‌هایی به گیرنده‌های سطح سلول، و برخی دیگر از این مسیرها در اثر فقدان برخی فاکتورهای رشد، راه‌اندازی می‌شوند. آسیب‌های شدید به ماده ژنتیکی سلول نیز، می‌تواند مسیرهای مختلفی، که منجر به آپوپتوز می‌شوند را راه‌اندازی کند.

۱-۶-۲-۱- دگرگونی‌های سلولی در هنگام آپوپتوز

در هنگام آپوپتوز حجم سلول کاهش یافته و در سلول ویزیکول‌های متعددی ایجاد می‌شوند. سپس کروموزوم‌ها متراکم شده و قطعه قطعه می‌شوند. در مراحل بعد، غشا هسته از بین می‌رود و در آخر، سلول بصورت ویزیکول‌های کوچکی، به چندین قسمت تقسیم می‌شود. در طول آپوپتوز، اندامک‌های داخلی سلول، مانند، میتوکندری‌ها و لیزوزوم‌ها سالم می‌مانند. ویزیکول‌هایی که از قطعه قطعه شدن سلول پدید می‌آیند، بوسیله فاگوسیت‌ها، بلعیده می‌شوند و هضم می‌شوند (۵۵)

۱-۶-۲-۲- مولکول‌های تنظیم‌کننده آپوپتوز:

۱-۶-۲-۱- پروتئین‌های خانواده B-cell lymphoma 2: مولکول BCL-2 ابتدا به عنوان پروانکوژن در لنفومال فولیکولار سلول‌های B شناسایی شد. سپس این مولکول به عنوان هومولوگ پستانداری یکی از اعضای اصلی آپوپتوز در C.elegance معرفی شد. BCL-2 یک پروتئین غشایی است که اساساً در غشای خارجی میتوکندری قرار دارد. نوزده عضو از خانواده BCL-2 در پستانداران شناسایی شده است. این خانواده چهار موتیف حفاظت شده BH1-BH2-BH3-BH4 دارد که باتوجه به فعالیت و ساختار به سه دسته تقسیم شده‌اند: الف-اعضای ضدآپوپتوز که شامل حداقل دو موتیف حفاظت شده هستند: BCL-2 و BCL-XL و غیره. ب-اعضای پروآپوپتوز که شامل چهار دسته حفاظت شده هستند (BCL-2-assosiated و Bak, Bax (X protein و غیره. ج-شامل Bik, Bin, Bad و غیره هستند. این گروه تنها دارای موتیف

حفاظت شده BH3 بوده و این ناحیه برای القای خاصیت شکنندگی کافی و ضروری است. اعضای ضد آپوپتوز و پروآپوپتوز به صورت هترو دایمر در می آیند و به نظر می رسد که اعمال یکدیگر را معین می کنند.

۱-۲-۶-۲-۲- کاسپازها: کاسپازها اجرایی ترین عضو مجموعه هستند. نام کاسپازها (-cysten spartate proteinase) از عملکرد آنها گرفته شده است. این خانواده در پستانداران چهارده عضو دارد، که یازده عضو آنها آنزیم های انسانی هستند. این آنزیم ها مسیر مرگ را هماهنگ می کنند و با تجزیه سوبستراهای مخصوص خود نقش مهمی در پیشبرد مرگ سلولی دارند. بیان این پروتئازها به صورت پروآنزیم (زیموژن) است و به وسیله شکسته شدن توسط سالین، کاسپازها یا گرانزیم B فعال می شوند. این آنزیم ها در حالت زیموژن سه ناحیه اصلی دارند: پیش دومین N-ترمینال، زیر واحد بزرگ شامل جایگاه فعال و زیر واحد کوچک شامل C-ترمینال. این سه ناحیه توسط آسپاراتات از هم جدا می شوند. کاسپازها پروتئازهای اختصاصی هستند و سوبسترای خود را از محل آسپاراتات خاصی که با توانایی کاسپاز سازگار است تجزیه می کنند و باعث تخریب پروتئین ها یا فعال شدن کاسپازهای دیگر می شوند. تمام کاسپازها به وسیله رویداد تجزیه ای پروتئازی فعال می شوند. کاسپاز فعال، تترامری شامل دو زیر واحد کوچک و دو زیر واحد بزرگ می باشد. اکتین، وایمنتین، کراتین و کادهرین سوبستراهای مناسبی برای کاسپازها محسوب می شوند. کاسپازها را از نظر تقدم و تاخر شرکت در فرآیند مرگ سلولی به دو دسته، آغازگر و اجرایی تقسیم می کنند. کاسپازهای آغازگر مانند کاسپاز ۸ در ابتدای فرایند فعال می شوند و کاسپازهای اجرایی مانند کاسپاز ۳ در مراحل بعدی و توسط کاسپازهای آغازگر فعال شده و آبشار کاسپازی را به راه می اندازند.

۱-۲-۶-۲-۳- ممانعت کننده های کاسپازی: سلول های طبیعی ممانعت کننده های خاصی را علیه کاسپازها به کار می گیرند. این پروتئین های مهار کننده، IAP (Inhibitor of apoptosis protein) نام دارند و اولین بار در باکولوویروس ها شناسایی شدند ولی به تدریج همولوگ های انسانی آنها نیز شناسایی شد. اتصال ممانعت کننده ها به کاسپازها و مهار کنندگی آنها به وسیله نواحی BIR Bacculoviral inhibition apoptosis

(protein repeat) موجود در IAP رخ می‌دهد. ناحیه BIR حفاظت شده است و ۷۰ اسید آمینه دارد که به صورت پشت سرهم در باکولوویروس تکرار می‌شوند. میتوان گفت IAP ها از طریق رقابت با سوبسترا برای اتصال به کاسپازها موجب ممانعت از فعالیت و در نهایت تخریب کاسپازهای شرکت کننده در فرآیند آپوپتوز می‌شوند.

۱-۲-۶-۲-۴- مولکول P53: مولکول P53 یکی از مهمترین مهار کننده‌های چرخه تکثیر سلولی است که آن را محافظ ژنوم می‌نامند. این مولکول با ایجاد وقفه در مرحله G2 باعث مهار چرخه سلولی میشود و با القای آپوپتوز از ایجاد تومور جلوگیری میکند. تخریب DNA عامل اصلی فعالیت این مولکول است.

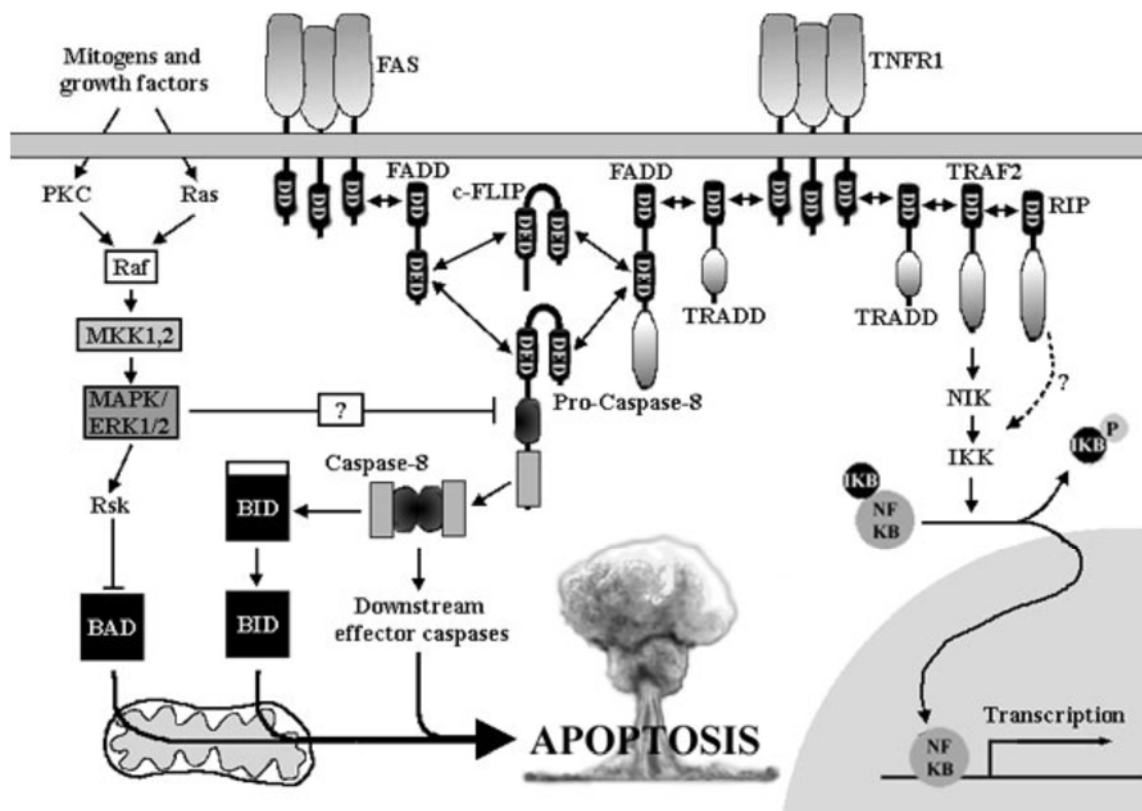
۱-۲-۶-۲-۵- یون کلسیم: هرگاه میزان یون کلسیم درون سلولی به واسطه فعالیت گسترده پمپ Ca^{2+} -ATPase افزایش یابد یا میزان کلسیم ورودی به اندامک‌هایی نظیر رتیلولوم اندوپلاسمی، هسته و مینوکندری زیاد باشد آنزیم‌های پروتئازی و اندونوکلازی وابسته به یون کلسیم فعال شده و مقدمات آپوپتوز فراهم می‌شود.

۱-۲-۶-۳- مسیرهای مرگ سلولی: بسته به اینکه پیام مرگ از چه طریقی به سلول ابلاغ شود مسیر فعال‌سازی مرگ سلولی متفاوت است. اگر پیام‌ها داخلی باشند اولین اندامک فعال شده میتوکندری خواهد بود. و اگر پیام از طریق رسپتورهای سطحی سلول بیان شود انتقال پیام از طریق مولکول‌های سازگارکننده (آداپتور) به آبشار کاسپازی خواهد رسید. میزان مرگ سلولی القا شده توسط رسپتورها شدیدتر از مسیر میتوکندریایی است.

۱-۲-۶-۳-۱- مسیر رسپتوری: رسپتورهای مرگ رسپتورهای سطحی سلول هستند که پیام را از طریق لیگاندهای مخصوص انتقال می‌دهند و آبشار کاسپازی را فعال می‌کنند. مهمترین رسپتورهای مرگ، خانواده‌ی رسپتوری TNF شامل، CD95(fas), TNFR-T, TRAIL-1, TRAIL-2, TRAMP هستند. در

انتهای کربوکسیل این رسپتورها ناحیه درون سلولی به نام DD(death domain) وجود دارد. وقتی این رسپتورها به لیگاند خود متصل می شوند مرگ سلولی اتفاق می افتد. اتصال \square -TNF به رسپتور موجب می شود مولکول TRADD (TNF-R associated death domain) از طریق واکنش DD به رسپتور TNF متصل شود و خود TRADD هم با DD دوم به خود DD مولکول Fas- FADD (death domain associated) اتصال یابد و FADD هم از طریق واکنش DED-DED(effecter death domain) به پروکاسپاز ۸ متصل شود. تجزیه و تبدیل پروکاسپاز ۸ به کاسپاز ۸ یا فرم فعال آن باعث راه اندازی آبشار کاسپازی می شود. در مرحله بعد، کاسپاز اجرایی ۳ فعال و به نوبه خود باعث فعال سازی سایر کاسپازهای اجرایی و پیشرفت چرخه آپوپتوز می شود.

۱-۲-۳-۲- مسیر میتوکندریایی: میتوکندری اصلی ترین اندامک فعال در مسیر مرگ سلولی می باشد. این اندامک با رهایی مولکول های فعال کننده مکانیسم خودکشی سلولی، به صورت مستقیم یا غیرمستقیم در این فرایند شرکت می کند. برخی آنکو پروتئین ها مثل محصولات ژن های مهار کننده تومور، عوامل عفونت زای ویروسی و عوامل دارویی می توانند از طریق تاثیر مستقیم بر روی میتوکندری، آپوپتوز را فعال کنند. این پدیده به بیماری های مختلفی نظیر سرطان، تخریب عصبی و ایدز منجر می شود. آبشار کاسپازی با رهایی سیتوکروم C از میتوکندری کامل می شود. مولکول های خانواده BCL-2 این مرحله را کنترل می کنند. سایر اعضای خانواده، فعالیت Bak و Bax را القا می کنند و سبب افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری و خروج سیتوکروم C از میتوکندری می شوند. سیتوکروم C مسیر میتوکندری را تحریک می کند و به یک مولکول پروتئینی به نام Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) متصل می شود. این اتصال و ترکیب شدن به Apaf-1 اجازه می دهد که ساختار آن تغییر شکل یابد و چندین مولکول Apaf-1 به هم متصل شوند. در این صورت حالت چرخمانندی بوجود می آید که شامل هفت مولکول Apaf-1 است. این حالت چرخمانند آپوپتوزوم نام دارد و میتواند هفت مولکول کاسپاز ۹ را به خدمت گیرد.



شکل ۱-۳: فرآیند آپوپتوز. تصویر بالا نشان دهنده‌ی مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز در سلول می‌باشد

۱-۲-۷- کانال‌های پتاسیمی انواع و نقش آنها در تنظیم فعالیت سلول‌ها و نورون‌ها

کانال‌های پتاسیمی گسترده‌ترین کانال‌های یونی در تمامی موجودات زنده می‌باشند. آنها در نورون‌ها و در تنظیم سطح پتانسیل استراحت غشا، شکل، مدت زمان و فرکانس شلیک پتانسیل عمل نقش دارند. این کانال‌ها همچنین نقش مهمی در تنظیم سطح تحریک‌پذیری سلول‌ها داشته و از این طریق فعالیت الکتریکی سلول‌ها را کنترل می‌کنند (۵۶، ۵۷).

این کانال‌ها پروتئین‌های ترانس‌ممبرانی هستند که نقش مهمی در عملکردهای طبیعی و پاتولوژیک تمامی سلول‌ها ایفا می‌کنند. کانال‌های پتاسیمی گوناگونی با اهداف درمانی در بیماری‌های پارکینسون آلزایمر و ایسکمی‌های مغزی و نخاعی شناسایی شده‌اند. برخی از کانال‌های پتاسیمی موجود در غشاهای پلاسمایی سلول‌های مختلف همچنین در غشای درونی میتوکندری آنها نیز به چشم می‌خورد. اینگونه تصور می‌شود

که کانال‌های پتاسیمی در تنظیم پتانسیل غشای میتوکندری، تنفس سلولی، حجم ماتریکس، همئوستاز یون کلسیم، اسیدپته و نیز آپوپتوز نقش دارند. ۵ نوع کانال پتاسیمی که در ادامه ذکر می‌شوند در غشای پلاسمایی بافت‌های مختلف در غشای درونی میتوکندری نیز به چشم می‌خورند:

۱- ۱- کانال پتاسیمی وابسته به ATP (ATP regulated-mitoK ATP)

۲- کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت بالا (large conductance Ca^{2+} -mitoBK ca) (regulated)

۱- کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت متوسط (large conductance -mitoBK ca) (ca²⁺+regulated)

۲- کانال پتاسیمی وابسته به ولتاژ (Voltage-Gated -mitoKv 1/3 type)

۳- کانال پتاسیمی (twin pore domain – mito TASK-3)

امروزه ثابت شده که افزایش جریان پتاسیم به درون میتوکندری سلول‌های مغزی توسط کانال ATP mitoK و کانال Ca^{2+} -mitoBK در شرایط پاتولوژیک اثرات سودمندی در بقای نورونی دارد. اخیراً توزیع افتراقی کانال‌های Ca^{2+} -mitoBK در میتوکندری‌های نورونی مشاهده شده است. این یافته‌ها نقش neuroprotective کانال‌های Ca^{2+} -mitoBK را در ساختارهای مغزی خاصی مشخص می‌کند. پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه بیولوژی کانال‌های یونی طی ۶۰ سال اخیر چشمگیرتر شده و امروزه تحقیقات کانال‌های یونی ادغامی از روش‌های الکتروفیزیولوژی فارماکولوژی زیست سلولی و ژنتیک می‌باشد. مطالعات ژنتیکی نشان داده‌اند که بیش از ۸۰ ژن در پستانداران زیرواحدهای کانال‌های پتاسیمی غشای سلولی را کدگذاری می‌کنند. امروزه به خوبی آشکار شده است که کانال‌های پتاسیمی خاص موجود در غشای پلاسمایی بیشتر سلول‌ها انواع گوناگون فعالیت‌های سلولی را کنترل می‌کنند. شواهدی نیز بیان می‌کنند که نقایص کانال‌ها نقش

اساسی در ایجاد بیماری‌های نورودژنراتیو ایفا میکنند. و نیز بیان شده که کانال‌های پتاسیمی میتوکندریایی راه اندازه‌ها و عمل‌کننده‌های نهایی طی فرآیند محافظت نورونی می‌باشند اما مکانیسم این فرآیند هنوز بطور دقیق شناسایی نشده است (۵۸).

۱-۷-۲-۱- کانال‌های پتاسیمی وابسته به ATP (ATP regulated) میتوکندریایی: مطالعات بیوشیمیایی و الکتروفیزیولوژیک شواهدی را مبنی بر حضور کانال‌های پتاسیمی ATP regulated در غشای درونی میتوکندری سلول‌های مختلف بیان میکنند. چنین کانال‌هایی در کبد، قلب، مغز، کلیه، عضله اسکلتی و نیز لنفوسیت‌های T انسانی شناسایی شده‌اند. علی‌رغم تلاش‌های صورت گرفته توسط گروه‌های مختلف اما هنوز ویژگی‌های مولکولی این کانال ناشناخته مانده است. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که این کانال متعلق به خانواده کانال $\text{inward rectifier } \text{K}^+$ می‌باشد. اخیراً پیشنهاد شده که مجموعه‌ای از ۵ پروتئین در غشای درونی میتوکندری قادر به انتقال یون پتاسیم می‌باشند. این مجموعه شامل ANT، PIC، ATPase، SDH، mABC1 می‌باشد. امروزه توسط تکنیک‌های Patch-Clamp نشان داده‌اند که کانال mitoK^+ توسط کلسیم و نیتریک‌اکسید، کنترل و میانجیگری می‌شود. به علاوه مشاهده شده که داروی بیهوشی Isoflurane مستقیماً باعث مهار فعالیت این کانال می‌گردد. داده‌هایی وجود دارد مبنی بر این که باز شدن این کانال‌های پتاسیمی طی فرآیند ایسکمی، دارای اثر محافظتی بر عملکرد نورون‌ها می‌باشد (۵۹).

۱-۷-۲-۲- کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت بالا ($\text{large conductance } \text{Ca}^{2+}\text{-mitoBK}$) (regulated) میتوکندریایی: اولین گزارشات در مورد کانال مذکور در اثر مطالعات میکروالکترودی نورون‌های molluscan ایجاد گشت. از زمانی که تکنیک‌های Patch-clamp

بکار گرفته شدند ثبت جریانات کانال که وابسته به سطح یون کلسیم می باشد به راحتی

امکان پذیر شد و محققان ۳ نوع کانال وابسته به کلسیم شناسایی کردند. بدین شرح:

-کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت بالا

-کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت متوسط

-کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت پایین

هریک از این کانال ها با توجه به ویژگی وابستگی به ولتاژ حساسیت به یون کلسیم و نیز فارماکولوژی شان آنالیز گشته اند. کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت بالا به صورت گسترده در غشای پلاسمایی سلول های تحریک پذیر و تحریک ناپذیر توزیع شده اند. کانال های مذکور در عضله صاف مغز و سلول های کرومافین و نیز در میتوکندری های سلول های مغزی و رده سلولی گلیومای انسانی یافت می شوند. این کانال تترامری از ۴ زیر واحد α است. این کانال توسط یون کلسیم تحریک شده و توسط charybdotoxin مهار می شود. همچنین اخیرا مشاهده شده که کانال های یونی میتوکندریایی به کاهش سطح اکسیژن حساس می باشند. استفاده از تکنیک های Patch-clamp مشخص ساخته که هیپوکسی باعث مهار نفوذپذیری منافذ کانال گشته اما در عوض باعث افزایش فعالیت کانال mitoBK ca در میتوکندری های کبد و آستروسیت های رت می گردد. پاسخ میتوکندریایی به تغییرات غلظت کلسیم سیتوزولی اثر شدیدی بر روی متابولیسم نوروها و بقای آنها دارد. مشاهده شده که اضافه کردن یون کلسیم به مغز رت ها باعث از بین رفتن پتانسیل غشای میتوکندری و در نتیجه افزایش تنفس میتوکندریایی می شود.

۱-۲-۷-۳- کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت متوسط ($\text{large conductance -mitoIK ca}$)

(ca^{2+} -regulated) میتوکندریایی: ویژگی های بیوفیزیکی این کانال مشابه کانال های پتاسیمی

وابسته به کلسیم موجود در غشای پلاسمایی می‌باشد. این کانال دارای ویژگی نفوذپذیری انتخابی به پتاسیم با محدوده هدایت (ps) ۹۰ تا ۱۰ می‌باشد. ویژگی‌های فارماکولوژیک کانال mitoIK ca مشابه کانال‌های یونی غشای پلاسمایی است. فعالیت این کانال در سطوح پایین کلسیم متوقف شده و مهار کننده‌های کانال Kca3/1 نظیر کلوتریمازول و TRAM-34 در غلظت‌های نانومولار از فعالیت این کانال جلوگیری می‌کنند. اما تاکنون کانالی مشابه کانال mitoIK ca در بافت مغزی مشاهده نشده است (۶۰).

۱-۲-۷-۴- کانال پتاسیمی وابسته به ولتاژ (Voltage Gated) میتوکندریایی: این کانال‌ها خانواده‌ای از کانال‌های یونی هستند که توسط تغییرات پتانسیل غشایی تنظیم می‌شوند. کانال‌های مذکور در حین بازگشت سلول دیپلاریزه به حالت استراحت ایفای نقش می‌کنند. کانال پتاسیمی نوع Kv1.3 به صورت اولیه در لنفوسیت‌های T بیان شده، اما در کلیه اپیتلیوم‌ها و دستگاه عصبی مرکزی نیز حضور دارد. همچنین نشان داده شده که کانال‌های پتاسیمی نوع Kv1.3 در تکثیر و نیز تنظیم حجم سلول نقش داشته و بدین ترتیب عدم عملکرد کانال‌های وابسته به ولتاژ باعث ایجاد بیماری‌های قلبی عصبی و اختلالات ایمنی می‌گردد. مطالعات صورت گرفته در سال ۲۰۰۵ نوعی کانال Kv1.3 حساس به margatoxin در میتوکندری‌های لنفوسیت T شناسایی شد. همچنین داده‌های بیوفیزیکی بیوشیمیایی فارماکولوژیک و نیز ژنتیکی بیان این نوع کانال را در میتوکندری لنفوسیت‌ها تایید کردند. ابتدا مطالعات میکروسکوپ الکترونی بر روی لنفوسیت‌های خون محیطی نشان داد که این نوع کانال در غشای درونی میتوکندری حضور دارد. بعدها مطالعات Patch-clamp حضور این نوع کانال را در غشای درونی میتوکندری با ویژگی‌هایی مشابه آنچه در غشای پلاسمایی وجود دارد. پس نشان داده شده که این کانال هم در میتوکندری و هم در غشای پلاسمایی وجود داشته اگرچه توالی پایانه انتهایی

N میتوکندریایی وجود ندارد. امروزه بر این عقیده‌اند که کانال Kv1.3 میتوکندریایی ممکن

است فاکتور مهمی در انتقال پیام‌های آپوپتوزی باشد (۶۱).

۱-۲-۷-۵- کانال پتاسیمی Twin-Pore Domain میتوکندریایی: کانال TASK-3 که عضوی از خانواده

کانال پتاسیمی Twin-Pore Domain می‌باشد دارای ۴ جز ترانس‌ممبران می‌باشد. این

کانال‌های حساس به اسید نوعی کانال معکوس‌کننده رو به داخل Inward (Rectifier) ضعیفی

می‌باشند. توزیع بافتی این کانال گسترده بوده و در هر دو سلول‌های تحریک‌پذیر و

تحریک‌ناپذیر یافت می‌شوند. کانال‌های مذکور در برخی اعمال فیزیولوژیک نظیر تنظیم

تحریک نورونی و نیز تنظیم مدت زمان وقایع پس سیناپسی دخالت دارند. اخیرا کانال

TASK-3 در میتوکندری‌ها نیز مشاهده شده است. تحقیقات ایمونوشیمی و زیست مولکولی

ثابت کرده‌اند که کانال TASK-3 در میتوکندری‌های ملانوما و سلول‌های کراتینوسیت نیز

وجود دارند. اگرچه ویژگی‌های عملکردی کانال‌های TASK-3 در غشای درونی میتوکندری

هنوز ناشناخته است. اما بیان ژن مربوط به کانال پتاسیمی Twin-Pore Domain در

میتوکندری‌های مغزی ثابت شده است (۹, ۶۱).

۱-۲-۸- مهار کننده‌های کانال‌های پتاسیمی: همانطور که ذکر شد، کاهش اندازه سلول و فعال شدن

کاسپازها از ویژگی خاص آپوپتوز می‌باشد. کارهای در دست انجام پیشنهاد کرده‌اند که

تغییراتی در جریانات یونی، خصوصا یون پتاسیم نقش محوری در پدیده آپوپتوز دارد. در

سلول‌های عصبی و ایمنی در طی پدیده آپوپتوز یون پتاسیم داخل سلولی به شدت کاهش

می‌یابد و خود این امر منجر به فعال شدن کاسپاز ۳ و ایجاد آپوپتوز می‌شود. افزایش جریان

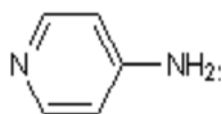
یون پتاسیم می‌تواند توسط فعالیت شدید کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ انجام شود. طی

یک سری تحقیقات نشان داده شده که تترااتیل آمونیوم (TEA) 4 آمینوپیریدین (4AP) و سایر مهارکننده های کانال های پتاسیمی باعث محدود شدن مرگ آپوپتوزی سلول ها در نورون های قشری کشت داده شده، سلول های کبدی و قشر مخ رت ها می گردد. 4AP دارویی است که در غلظت های میلی مولار کانال های پتاسیمی و آپوپتوز را مهار می کند (۸، ۶۲)

دندروتوکسین (Dendrotoxin)، یک نوع مهار کننده کانال های پتاسیمی وابسته به ولتاژ نوع A باعث آسیب های حرکتی و نیز آسیب به نئوکورتکس و ساب کورتکس می گردد. در مقابل، ۴ آمینوپیریدین، یک مهار کننده وسیع الطیف کانال های پتاسیمی، باعث ایجاد آسیب حرکتی شده و از مرگ نورونی جلوگیری می کند (۶).

۱-۲-۹- ۴-آمینوپیریدین (4-AP):

4-AP یک ترکیب آلی با فرمول شیمیائی $C_5H_6N_2$ است. این ملکول یکی از ۳ آمین ایزومر پیریدین است و دارای وزن ملکولی ۹۴/۱۲، درجه خلوص $> 99\%$ و ظاهر سفید رنگ است. این ملکول به عنوان ابزار پژوهش مورد استفاده قرار گرفته و در توصیف زیرگروه های پتاسیم و همچنین به عنوان دارو استفاده می شود این ترکیب شیمیائی در سال ۲۰۰۸ تحت فاز ۳ تحقیقات بالینی بود و در ۲۲ ژانویه ۲۰۱۰ توسط



سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) تأیید شد (۱۳).

این ترکیب آلی به روش دکربنولاسیون، پیریدین-۴-کربوکسامید با استفاده از هیپوکلرید سدیم از طریق بازآرایش Haffman آماده می شود.

۱-۹-۲-۱- کاربردهای 4-AP:

۱-۱-۹-۲-۱- کاربردهای صنعتی:

بزرگترین مقیاس کاربرد صنعتی 4-AP این است که به عنوان پیش ماده پیناسیدیل مواد مخدر که بر روی کانال های یونی پتاسیم تاثیر میگذارد، استفاده می شود. در آزمایشگاه یک ابزار مفید دارویی در مطالعه قابلیت هدایت پتاسیم در فیزیولوژی و بیوفیزیک است و یک مهارکننده نسبتاً انتخابی کانال های پتاسیمی وابسته به ولتاژ است و در غلظت ۱ میلی مول به طور انتخابی و برگشت پذیر برخی کانال های پتاسیمی را مهار می کند، بدون اثر قابل توجهی روی هدایت سدیم، کلسیم و پتاسیم (۶۳). 4-AP یک فعالیت تشنج زائی قوی دارد و برای ارزیابی عوامل ضد تشنجی در مدل های حیوانی در آزمایشگاه مورد استفاده قرار می گیرد.

4-AP4-AP تحت نام تجاری Avitrol (۱ یا ۰/۵ درصد) در طعمه پرندگان استفاده می شود که این امر باعث تشنج و به ندرت مرگ وابسته به دوز می شود (۶۴).

۱-۹-۲-۲- کاربردهای پزشکی:

این مهارکننده کانال های پتاسیمی در پزشکی در درمان بیماری MS استفاده می شود و باعث طولانی تر شدن پتانسیل های عمل و در نتیجه افزایش انتشار انتقال دهنده عصبی در محل اتصال عصبی-عضلانی است. در حال حاضر یک نسخه تجاری از آن به نام Ampyra به میزان ۱۰ میلی گرم برای مبتلایان به MS در دسترس است. به نظر می رسد، 4-AP در درمان بیماران مبتلا به آسیب های کانال نخاعی هم موثر باشد این بهبود شامل حسی، حرکتی و عملکرد ریوی همراه با کاهش اسپاسم و درد است AP همچنین یک فعال کننده کانال های کلسیم قوی است و میتواند عملکرد عصبی-عضلانی را با فعالیت مستقیم روی زیر واحدهای کانال های بتای کلسیم بهبود بخشد (۱۷، ۶۵، ۶۶).

۱-۲-۹-۲- عوارض

عوارض جانبی شامل سرگیجه، عصبانیت و حالت تهوع است بروز این علائم کمتر از ۵ درصد در تمامی مطالعات نشان داده شده است. گزارش‌ها نشان داده‌اند که مصرف بیش از حد 4-AP می‌تواند باعث فلج، تشنج و همچنین باعث فیبریلاسیون دهلیزی شود (۶۳).

۳-۱- اهداف و فرضیات

۱-۳-۱- هدف اصلی طرح

بررسی اثر پیش تیمار با ۴-آمینوپیریدین بر ایجاد بیماری پارکینسون در مدل حیوانی ۶-هیدروکسی دوپامین

۲-۳-۱- اهداف فرعی

۱-۲-۳-۱- بررسی اثر دوز 4-AP، 1mg/kg بر ایجاد بیماری پارکینسون در مدل حیوانی ۶-هیدروکسی

دوپامین

۲-۲-۳-۱- بررسی اثر دوز 4-AP، 0/5mg/kg بر ایجاد بیماری پارکینسون در مدل حیوانی ۶-

هیدروکسی دوپامین

۳-۳-۱- اهداف کاربردی

در صورت مثبت بودن نتایج تکرار آزمایش در دیگر مدل‌های حیوانی پارکینسون توصیه می‌گردد.

۴-۳-۱- فرضیه‌ها یا سؤال‌های پژوهش:

۱-۴-۳-۱- 4-AP می‌تواند در مدل حیوانی در پیشگیری از بیماری پارکینسون موثر باشد.

۲-۴-۳-۱- اثر 4-AP در پیشگیری وابسته به دوز می‌باشد و دوز 1mg/kg موثرترین دوز می‌باشد

فصل دوم

مروری بر متون

بیماری پارکینسون یک بیماری نورودژنراتیو است که به واسطه از دست رفتن نورون‌های دوپامینرژیک مغز میانی و کاهش متعاقب دوپامین در استریاتوم ایجاد می‌گردد. استریاتوم قسمتی از عقده‌های قاعده‌ای مغز می‌باشد. کانال‌های پتاسیمی به طور گسترده در عقده‌های قاعده‌ای مغز بیان شده‌اند به نظر می‌رسد اختلال در این کانال‌های پتاسیمی در پاتوژنز بیماری پارکینسون نقش داشته باشد (۱۲).

کانال‌های پتاسیمی نقش زیادی در تنظیم شلیک نورون‌ها ایفا می‌نمایند. جریان‌ات یونی از این کانال‌ها مدت زمان و ریپولاریزاسیون پتانسیل عمل، هیپرپلاریزاسیون متعاقب اسپایک اول و تاخیری و فاصله بین اسپایک‌های سدیمی را تنظیم می‌نمایند. مهار این کانال‌ها سبب دپولاریزاسیون نورون‌ها، افزایش فرکانس شلیک و تغییر الگوی شلیک از حالت تونیک به حالت انفجاری می‌شود. مطالعات الکتروفیزیولوژیکی نشان داده‌اند که کانال‌های پتاسیمی متفاوتی در نورون‌های پستانداران وجود دارند (۹, ۶۷).

شواهد روزافزون نشان می‌دهند که فعالیت الکتریکی نیز ممکن است در مرگ و بقای نورونی نقش داشته باشند. در مغز بزرگسالان تغییراتی در جریان‌ات یونی می‌تواند به طور فعال در مرگ سلول‌های عصبی در بیماری پارکینسون نقش داشته باشد. فعالیت نورون DA نه تنها برای کنترل ترشح دوپامین بلکه برای بقای نورون‌ها در طی تکامل مغز ضروری می‌باشد. فاکتور نوروتروفیک مشتق از سلول‌های گلیال (GDNF) عامل محافظت نورونی برای فعالیت کانال‌های پتاسیمی نوع A محسوب می‌شود. این نشان می‌دهد که ممکن است GDNF با مهار کانال‌های پتاسیمی نوع A در بقای سلول نقش داشته باشد (۶, ۶۸).

Wood fork KA و همکارانش دریافتند که مهار کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP باعث توقف چرخه سلولی برگشت‌پذیر سلول‌های سرطان پستان در فاز (G0/G1) در محیط کشت می‌شود. آنها میزان

تکثیر و گسترش چرخه سلولی سلول‌های سرطان پستان را به هر یک از آنتاگونیست‌های کانال‌های پتاسیمی بررسی کردند. از بین داروهایی که استفاده کردند تنها کنیدین و گلبین‌کلامید و لینوکلیرید بر روی MCF چرخه سلولی، زنده ماندن و توزیع چرخه سلولی اثر گذاشتند (۷).

Skryma RN و همکاران در سال ۱۹۹۷ بر روی قابلیت هدایت پتاسیم و نقشش روی تکثیر سلول‌های LNCaP و سلول‌های سرطان پروستات حساس به آندروژن کار کردند، و دریافتند سلول‌های سرطانی پروستات LNCaP دارای نوع جدیدی از کانال‌های پتاسیمی هستند که نقش مهمی در فیزیولوژی و عملکرد پاتولوژیکی این سلول‌ها و به طور خاص در تکثیر سلولی ایفا می‌کنند که این کانال‌های پتاسیمی با افزایش کلسیم داخل سلولی و TEA به میزان ۲ میلی‌مول و ۲ نانومول دتروتوکسین (DTX) مهار می‌شوند (۶).

از طرف دیگر نشان داده شده است که فعالیت آنزیم‌ها، نوکلئازها و کاسپازها که سیگنال‌های مرگ را هدایت و تقویت می‌نمایند و از این طریق سبب آپوپتوز می‌شوند، وابسته به یون پتاسیم می‌باشند.

Grishin A و همکارانش در سال ۲۰۰۵ دریافتند مهار کانال‌های پتاسیمی در آنتروسیت‌های روده‌ای سبب تضعیف آپوپتوز می‌شود. جریان پتاسیم در روند آپوپتوز سلول‌های آنتروسیت ضروری است و به زودی اتفاق می‌افتد آنها دریافتند استفاده از مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی مانند TEA، 4AP، استروماتوکسین از شکسته شدن DNA، فعالیت کاسپازها و رها شدن سیتوکروم C از میتوکندری و کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و در نتیجه آپوپتوز جلوگیری می‌کند (۶۲).

Hernandez-Enriquez و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نقش جریانات یون پتاسیم را روی مرگ سلولی و کاهش حجم آپوپتوتیک در نورون‌های گرانولار مخچه‌ای کشت داده شده، بررسی کردند آنها دریافتند نورون‌های گرانولار مخچه‌ای (CGN) در ۳ حالت دچار آپوپتوز و کاهش حجم آپوپتوتیک می‌شوند: تحت تاثیر استارواسپورین‌ها، تحت تاثیر کامپوتوتین (CPT) یا وقتی که سلول‌ها از پتاسیم خارج سلولی بالا

(25mM) به پتاسیم خارج سلولی کم (5mM) منتقل می شوند. سپس آنها دریافتند دو نوع مختلف مهارکننده های کانال های پتاسیمی یعنی سزیم و TEA از کاهش حجم آپتوتیک و آپتوز نورون های (CGN) جلوگیری می کند (۶۹).

JIA chun-hong و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بر روی پیناسیدیل که یک بازکننده کانال های پتاسیمی وابسته به ATP است کار کردند و دریافتند پیناسیدیل، می تواند بیان BCL2، mRNA و پروتئین را افزایش دهد. همینطور آپتوز نورونی را کاهش دهد و در نهایت آسیب سلولی PC12 را که به وسیله ایسکمی و هایپوکسی ایجاد شده بود را تضعیف کند (۷۰).

YU Sp و همکارانش در سال ۱۹۹۹ بر روی نقش جریان های پتاسیمی یکسوکننده تاخیری در فعالیت کاسپاز و آپتوز القاشده با سرامید در نورون های قشری کشت داده شده، کار کردند و دریافتند افزایش پتاسیم خارج سلولی به ۲۵ میلی مول مرگ سلولی القاشده با c2 سرامید را مهار می کند و اثر حفاظت نورونی بوسیله ۲۵ میلی مول یون پتاسیم یا TEA به وسیله مهار کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ از بین نرفته بود. یک مهارکننده تیروزین کیناز، Herbimycin A و lavendustin A، افزایش یون پتاسیم و یا آپتوز القاشده با c2 سرامید را سرکوب می کند. آنها در نهایت پیشنهاد کردند که افزایش جریان یون پتاسیم القاشده با سرامید به وسیله فسفوریلاسیون تیروزین، نقش حیاتی در آپتوز نورونی ایفا می کند (۷۲).

Aizenman و همکاران در سال ۲۰۰۰ گزارش دادند، (DTDP) 2'-2-dithiodipyridine که باعث القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی در سلول های عصبی گشته می تواند توسط مهارکننده کانال های پتاسیمی (TEA) و یا سطوح بالای پتاسیم خارج سلولی مهار کرد (۷۱).

Shi L و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد که کانال های پتاسیمی در مرگ آپتوزی القا شده با روی، در سلول های MES23.5 درگیر می باشند. آنها متوجه شدند که چگالی جریان K^+

متعاقب درمان با ۶۰ میلی مول روی در مدت ۴-۸ ساعت افزایش یافته بود. پس از تزریق ۲۰ میلی مول TEA جریان پتاسیم به طور کامل مسدود شده بود. این داده‌ها نشان می‌دهد که اثر آپوپتوزی مدکور ممکن است به علت افزایش فعالیت TEA-کانال‌های پتاسیمی حساس به TEA باشد (۷۲).

۴-آمینوپیریدین (4-AP) یک ترکیب آلی می‌باشد که طیف بزرگی از کانال‌های پتاسیمی به ویژه کانال‌های پتاسیمی غیرفعال‌شونده سریع، که جریان پتاسیمی نوع A را میانجی می‌نمایند مهار می‌کند (۱۳). از طریق مهار این کانال‌ها، 4-AP تحریک‌پذیری نورون‌ها را افزایش داده و سبب افزایش شلیک پتانسیل عمل در آنها می‌شود، نورون‌های خاموش را فعال می‌نماید و در برخی نورون‌ها الگوی شلیک را از مد تونیک به شلیک انفجاری تبدیل می‌نماید (۱۴، ۱۵). شلیک انفجاری خروجی نورون‌ها را با فرکانس بالا برای مدت کوتاه سبب گردیده و اثرات قوی‌تری بر سلول‌های هدف نورون اعمال می‌نماید.

گودرزی و همکاران در سال ۲۰۱۰ دریافتند 4AP می‌تواند تخریب نورونی ناشی از سم 3-acetylpyridine (3-AP) در سلول‌های پورکنژ مخچه موش‌های صحرانی را کاهش دهد و به این ترتیب از بروز حملات درموش‌های مبتلا به آتاکسی‌اپیسودیک نوع ۲ جلوگیری کند (۱۶).

حقدوست و همکارانشان در سال ۲۰۱۱ رابطه تاثیر 4-AP در درمان و کاهش شدت علائم رفتاری بیماری پارکینسون درموش‌های صحرایی را بررسی کردند و دریافتند دوز کم 4-AP (۰/۲ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن) و متوسط (۰/۵ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن) در درمان بیماری پارکینسون اثری نداشت ولی دوز بالا (۱ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن) موثر بود حقدوست و همکاران نشان دادند که 4-AP اثرات قابل توجهی در درمان بیماری پارکینسون دارد (۲۶).

STRUPP و همکاران در سال ۲۰۰۷ دریافتند 4-AP میتواند فرکانس حملات را در بیماران مبتلا به آتاکسیا اپسودیک نوع ۲ کاهش دهد و باعث بهبود کیفیت زندگی این بیماران گردد در این تحقیق مشخص گردید که کاربرد 4-AP از حملات این بیماری جلوگیری کرده و پیگیری بیماران در عرض ۶ ماه نشان داد که حملات بیماری نیز متوقف شده است (۶۵).

Kalla R و همکاران در سال ۲۰۱۱ دریافتند که مصرف ۱۰ میلی گرم 4AP و ۳ و ۴ دی آمینوپیریدین در بیماران مبتلا به نیستاگموس باعث بهبود عملکرد و شدت تحریک پذیری سلول های پورکنژ مخچه که واسطه عدم لرزش کره چشم است می شود (۶۶).

JUDGE و همکاران در سال ۲۰۰۶ دریافتند که 4-AP می تواند هدایت ایمپالس را در آکسون های آسیب دیده طناب نخاعی در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس (MS)، افزایش دهد و به عنوان یک دارو در درمان این بیماری استفاده شود (۷۳).

WU ZZ و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند 4-AP با مهار کردن کانال های پتاسیم می تواند انتقال عصبی عضلانی را در بیماران مبتلا به میاستنی گراویس بهبود بخشد همچنین مشتقات آمینوپیریدینی می تواند کانال های کلسیمی فعال ولتاژ بالا را (HVACCS) را به رها کردن نورو ترانسمیترهای مستقل کانال های پتاسیمی وادار کند (۷۴).

Franciosi S و همکاران در سال ۲۰۰۶ دریافتند که دوزهای مختلف 4-AP روی آمیلوئید بتا ۱ در میکروگلیای انسان می تواند به عنوان یک استراتژی درمانی برای بیماران مبتلا به آلزایمر بکار گرفته شود (۲۲). (آمیلوئید بتا پروتئین غشایی، که به میزان زیادی در سیستم عصبی بیان شده و در یادگیری و بقاء سلولی دارای نقش می باشد، می تواند از طریق فعال کردن جریان پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت بالا

سبب سمیت نورونی گردد. و تصوری شود که اختلال در این پروتئین ممکن است در بیماری آلزایمر نقش داشته باشد).

Kita T و همکاران در سال ۱۹۸۵ تاثیر 4-AP را روی نورون‌های نئواستریاتال موش در محیط آزمایشگاه بررسی کردند. نورون‌های اینتراسلولار قادر به ثبت پتانسیل استراحت غشای بیش از ۵۰ میلی‌ولت و قادر به تولید پتانسیل عمل با دامنه بیش از ۶۰ میلی‌ولت بودند. و کاربرد 4-AP باعث افزایش دپلاریزاسیون غشای سلولی، افزایش مقاومت ورودی آن می‌شود. همچنین موجب افزایش دامنه و طول مدت پتانسیل پس‌سیناپسی نیز می‌شود. آنها، نشان دادند که 4-AP اثراتی روی تحریک ناشی از پاسخ‌های پس‌سیناپسی نورون‌های نئواستریاتال دارد (۷۵).

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳-۱-مواد:

۴آمینوپیریدین (4-AP)

سم ۶هیدروکسی دوپامین (6-OHDA)

آپومورفین

موش صحرائی نر

کتامین

گزیلازین

ست جراحی

سرنگ انسولین

سرنگ هامیلتون ۱۰ میکرولیتر

غذای حیوانات

اسید اسکوربیک

نرمال سالین

پنبه و الک

دستکش و ماسک

۶ هیدروکسی دوپامین، آپومورفین، ۴ آمینوپیریدین از شرکت sigma خریداری شده‌اند و اسید اسکوربیک از MERCK خریداری شده است

سم ۶ هیدروکسی دوپامین و آپومورفین بلافاصله قبل از تزریق آماده می‌شدند. ۴ آمینوپیریدین نیز به صورت حل شده در نرمال سالین وجود داشت.

۳-۲- نمونه حیوانی و گروه‌های آزمایشی:

موش‌های صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار ($n=48$) در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۵۰g که از موسسه رازی (کرج) خریداری شده‌اند. این موش‌ها در حیوان‌خانه دانشگاه در قفس‌های بزرگی با ابعاد $38 \times 59 \times 20$ در اتاقی با درجه حرارت کنترل‌شده و شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، و در حالی که به آب و غذا به صورت نامحدود دسترسی داشتند نگهداری شده‌اند. موش‌ها در شروع آزمایش به ۶ گروه تقسیم شدند: ۱- گروه سالین حاد که ۰/۱ میلی‌لیتر سالین مطابق الگوی دیگر گروه‌های حاد دریافت کردند ($n=8$). ۲- گروه 4-AP مدل حاد بادوز کم که از نیم‌ساعت قبل از تزریق سم 6-OHDA تا ۷ روز پس از آن روزی ۲ بار ۰/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن 4-AP به صورت درون صفاقی دریافت کردند ($n=9$). ۳- گروه 4-AP مدل حاد با دوز زیاد که از نیم‌ساعت قبل از تزریق سم 6-OHDA تا ۷ روز پس از آن روزی ۲ بار ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن 4-AP به صورت درون صفاقی دریافت کردند ($n=8$). ۴- گروه سالین مزمن که ۰/۱ میلی‌لیتر سالین مطابق الگوی دیگر گروه‌های مزمن دریافت کردند ($n=8$). ۵- گروه 4-AP مدل مزمن با دوز کم که از نیم‌ساعت قبل از تزریق سم تا ۱۵ روز پس از آن روزی ۲ بار ۰/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن 4-AP به صورت درون صفاقی دریافت کردند ($n=8$). ۶- گروه 4-AP مدل مزمن با دوز زیاد که از نیم‌ساعت قبل از تزریق سم تا ۱۵ روز پس از آن روزی ۲ بار ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلو

وزن بدن 4-AP به صورت درون صفاقی دریافت کردند (n=7). بر روی تمامی موش‌ها جراحی استرئوتاکسیک و تزریق سم 6-OHDA انجام شد. نتایج یک گروه دیگر به نام گروه موش‌های سالم (n=10) در تحلیل نتایج آزمون روتارد استفاده شد. موش‌های سالم جراحی نشدند و سم 6-OHDA و یا داروی دیگری دریافت نکردند.

۳-۳- طراحی تحقیق

روش انجام این تحقیق شامل ۳ مرحله می‌شد:

۱- پیش تیمار با مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی

۲- جراحی استرئوتاکسیک و تزریق سم ۶-هیدروکسی دوپامین

۳- انجام آزمون‌های رفتاری

۳-۴- روش انجام این تحقیق برای گروه‌های حاد شامل:

۱- پیش‌تیمار با مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی: همه گروه‌ها به غیر از گروه موش‌های سالم، از نیم

ساعت قبل از جراحی ۴ آمینوپیریدین را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. و تزریقات هر ۱۲

ساعت (روزی ۲ بار) انجام شد و تا ۱ هفته پس از جراحی تزریقات ادامه داشت.

۲- جراحی استرئوتاکسیک و تزریق سم ۶-هیدروکسی‌دوپامین: حیوانات را در ابتدا با استفاده از تزریق

کتامین/زایلازین (6/60 mg/kg) به صورت داخل صفاقی بیهوش کرده و سپس در دستگاه

استرئوتاکس قرار داده شدند (شکل ۳-۱). در پوست سر یک برش طولی به اندازه ۲ سانتیمتر ایجاد

شده و سطح استخوان آشکار می‌شود. سپس نقطه برگما مشخص شده و با استفاده از دستگاه

استرئوتاکس و به کمک اطلس پاکسینوز و واتسون (۷۶) محل مورد نظر تزریق با مختصات زیر

نشانه‌گذاری می‌گردد (شکل ۳-۲).

| | | |
|----|------|------|
| AP | -4 | -4.4 |
| L | -0.8 | -1.2 |
| V | -8 | -7.8 |

سپس سطح جمجمه با مته دندانپزشکی سوراخ گردیده. و با استفاده از سرنگ هامیلتون 6

میکرولیتزر از محلول حاوی سم نوروتوکسیک 6-OHDA هیدروبروماید (با غلظت ۱۵-

۱۰ میکروگرم حل شده در سالین حاوی ۰/۲ درصد اسید اسکوربیک) به ۲ ناحیه در دسته میانی

مغز جلویی (MFB) راست نزدیک جسم سیاه تزریق گردید. سم 6-OHDA به آهستگی و در

عرض ۵ دقیقه تزریق شد، در پایان سرنگ برای ۵ دقیقه در محل خود نگه داشته و به آهستگی با

سرعت 1mm/min از مغز بیرون آورده شد (شکل ۳-۳).

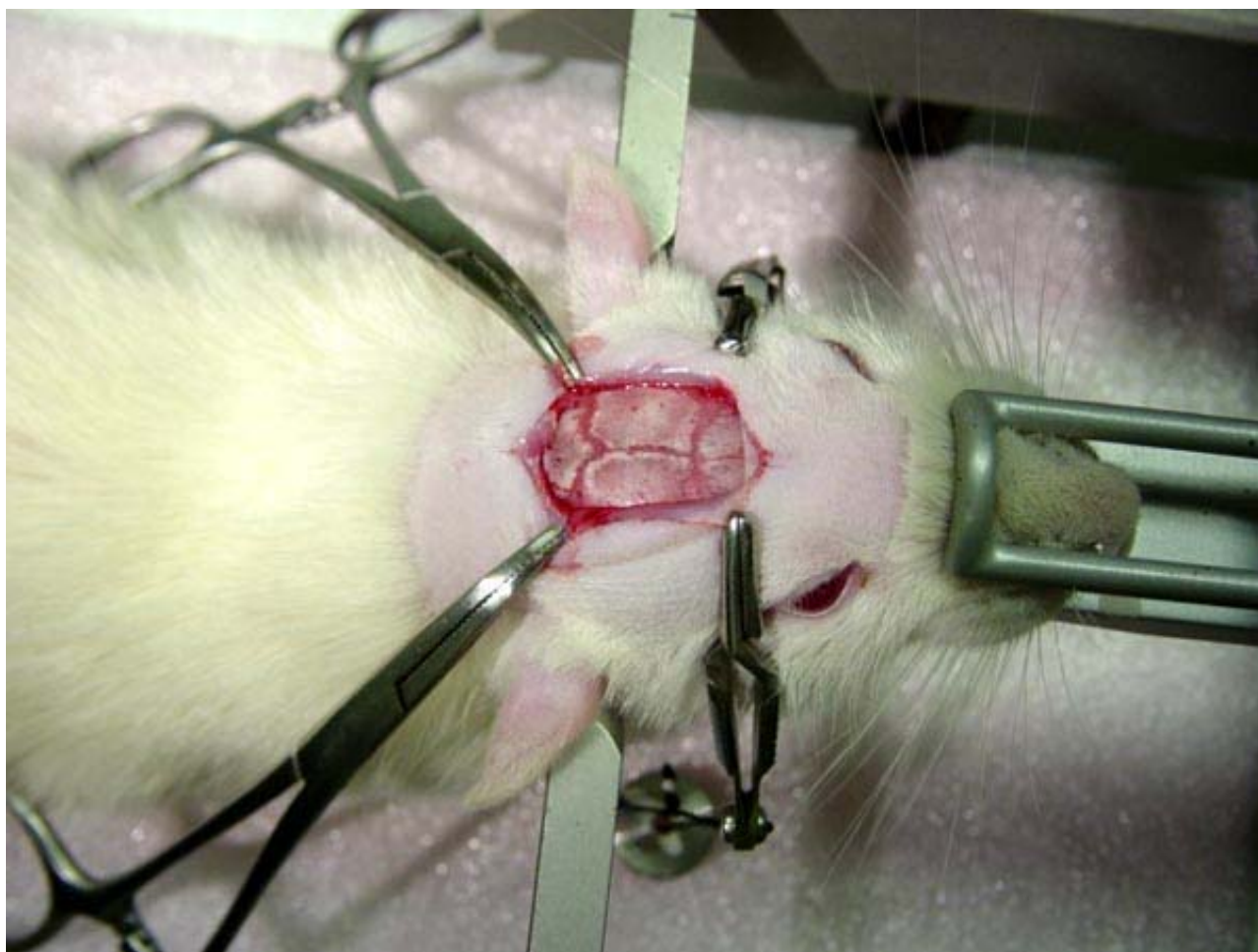
۳- انجام آزمون‌های رفتاری: در هفته‌های سوم، پنجم و هشتم پس از جراحی استریوتاکسی و تزریق

سم 6-OHDA آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین و پیچش بدن بالارفته انجام گرفت و در هفته

هفتم آزمون روتارد انجام گرفت.



شکل ۳-۱: موش‌ها را پس از بیهوش کردن در دستگاه استرئوتاکس قرار می‌دهیم



شکل ۳-۲: نقطه برگما یعنی همان محل مورد نظر تزریق نشانه گذاری می شود.



شکل ۳-۳: سپس سطح جمجمه با مته دندانپزشکی سوراخ گردیده. و با استفاده از سرنگ هامیلتون محلول حاوی سم نوروئوکسیک 6-OHDA به ناحیه MFB یا استریاتوم تزریق می‌شود. سم 6-OHDA به آهستگی و در عرض ۵ دقیقه تزریق می‌شود، در پایان سرنگ برای ۵ دقیقه در محل خود نگه داشته و به آهستگی با سرعت 1mm/min از مغز بیرون آورده می‌شود.

۳-۵- روش انجام این تحقیق برای گروه‌های مزمن شامل:

۱- پیش‌تیمار با مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی: همه گروه‌ها به غیر از گروه موش‌های سالم از نیم

ساعت قبل از جراحی ۴ آمینوپیریدین را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. و تزریقات هر

۱۲ ساعت (روزی ۲ بار) انجام شد و تا ۲ هفته پس از جراحی تزریقات ادامه داشت.

۲- جراحی استرئوتاکسیک و تزریق سم ۶-هیدروکسی‌دوپامین: حیوانات را در ابتدا با استفاده از تزریق

کنامین/زایلازین (6/60 mg/kg) به صورت داخل صفاقی، بیهوش کرده و سپس در دستگاه استرئوتاکس قرار

داده شدند (شکل ۳-۱). در پوست سر یک برش طولی به اندازه ۲ سانتیمتر ایجاد شده و سطح استخوان

اشکار می‌شود. سپس نقطه برگما مشخص شده و با استفاده از دستگاه استرئوتاکس و به کمک اطلس

پاکسینوز و واتسون (۷۶) محل مورد نظر تزریق با مختصات زیر نشانه‌گذاری می‌گردد (شکل ۳-۲).

| | | | | |
|----|------|-----|------|------|
| AP | 1.50 | 0.8 | 0.1 | -0.5 |
| L | -2.5 | -3 | -3.2 | -3.6 |
| V | 6 | 6 | 6 | 6 |

سپس سطح جمجمه با مته دندانپزشکی سوراخ گردیده. و با استفاده از سرنگ هاملتون ۱۰ میکرولیتر از

محلول حاوی سم نوروتوکسیک **6-OHDA** هیدروکلراید (با غلظت ۱۵-۱۰ میکروگرم حل شده در سالین

حاوی ۰/۲ درصد اسید اسکوربیک) به ۴ ناحیه در استریاتوم راست تزریق گردید. سم 6-OHDA به

آهستگی و در عرض ۵ دقیقه تزریق شد در پایان سرنگ برای ۵ دقیقه در محل خود نگه داشته و به آهستگی

با سرعت 1 mm/min از مغز بیرون آورده شد (شکل ۳-۳).

انجام آزمون‌های رفتاری: در هفته‌های چهارم، ششم و هشتم پس از جراحی استریوتاکسی و تزریق سم 6-

OHDA آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین و پیچش بدن بالارفته انجام گرفت و در هفته هشتم آزمون

روتارد انجام گرفت .

۳-۶- آزمون‌های رفتاری

آزمون‌های رفتاری شامل موارد زیر است:

الف) آزمون چرخش القا شده با آپومورفین (آزمون چرخشی)

ب) آزمون پیچش بدن بالارفته (elevated body swing test, EBST) (آزمون سوئینگ)

ج) آزمون روتارد

در زیر روش انجام هر یک از این آزمون‌ها شرح داده شده است:

۳-۶-۱- آزمون چرخش القاشده با آپومورفین:

این آزمون بر اساس روش بکار برده شده توسط فوجی و همکاران در سال ۱۹۹۶ صورت گرفت (۷۷). به طور خلاصه چنانچه تزریق سم 6-OHDA سبب تخریب گسترده نورونی در هسته جسم سیاه گردد ۲ تا ۴ هفته پس از جراحی موش‌ها در قبال تزریق آپومورفین چرخش‌های پی‌درپی را به سمت مقابل محل تزریق نشان می‌دهند که تعداد این چرخش‌ها در واحد زمان معیاری از شدت تخریب نورونی در جسم سیاه و تاثیر مداخله می‌باشد. برای اجرای این آزمون ابتدا موش‌ها در داخل یک استوانه پلکسی‌گلاس شفاف با ابعاد ۲۸ سانتی‌متر قطر و ۳۸ سانتی‌متر ارتفاع قرار داده و به آنها ۵ دقیقه جهت سازش با محیط زمان داده می‌شود. سپس آپومورفین هیدروکلراید $5/0 \text{ mg/kg}$ حل شده در سالین به موش‌ها تزریق شده و ۱ دقیقه پس از آن تعداد چرخش‌ها به طرف محل تزریق سم (عدد منفی) و یا خلاف آن (عدد مثبت) به مدت یک ساعت ثبت گردیده است. در پایان تعداد چرخش خالص موش‌ها به یک طرف با جمع جبری اعداد بدست آمده محاسبه شده است.

۳-۶-۲-آزمون پیچش بدن بالارفته (elevated body swing test, EBST):

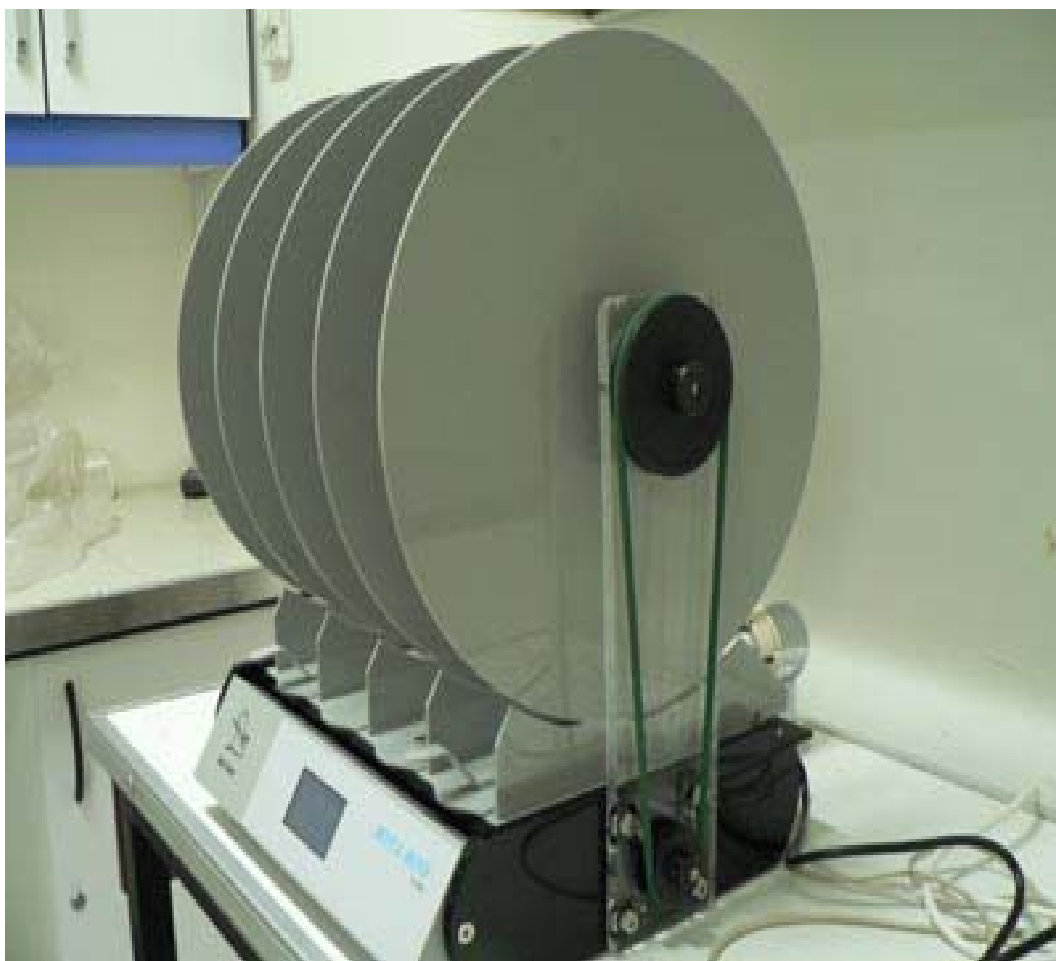
. این آزمون بر طبق روش شرح داده شده توسط Borlongan و همکاران در سال ۱۹۹۵ صورت گرفت (۷۸). به طور خلاصه دم موش از محدوده ۲ سانتی متری محل اتصال با بدن گرفته شده و به بالا آورده می شود به طوری که بینی حیوان ۲ سانتیمتر بالای سطح اتکا قرار گیرد. در این حالت حیوان بدن خود را به سمت راست یا چپ می پیچاند که تعداد این پیچش ها به هر طرف نشان دهنده شدت بیماری می باشد. تعداد پیچش ها به راست یا چپ در مدت زمان ۱ دقیقه شمارش و انحراف در پیچش بدن به این صورت محاسبه میشود: $R/(R + L)$ (%) یا $L/(L + R)$ (%) (تعداد پیچش به چپ = L و تعداد پیچش به راست = R) در حیواناتی که بوسیله سم ۶-هیدروکسی دوپامین پارکینسونی شده اند این پیچش ها عمدتاً به سمت مقابل محل تزریق سم می باشد.

۳-۶-۳- آزمون روتارود: آزمون روتارود توانایی اجرای فعالیت‌های حرکتی (motor performance) را مورد ارزیابی قرار می‌دهد. با کمک این آزمون هماهنگی حرکات، حفظ تعادل و مهمتر از همه توانایی یادگیری حرکتی در حیوانات مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. از این رو این آزمون روتارود، آزمون معتبر و قابل اعتمادی در بررسی اختلالات بخش‌هایی از سیستم عصبی که درگیر کنترل حرکات می‌باشند (مانند مخچه و بازال گانگلیا) می‌باشد. روش اجرای آن اصولاً برگرفته از روش معرفی شده توسط لاندبلد و همکاران می‌باشد (۷۹). به طور خلاصه، دستگاه روتارود شامل یک چارچوب پلاستیکی می‌باشد که در آن میله‌های استوانه‌ای با قابلیت چرخش در سرعت‌های مختلف تعبیه شده‌اند که حیوان می‌تواند بر روی آن قدم بزند. در این آزمایش سرعت چرخش میله‌های استوانه‌ای به گونه‌ای تنظیم می‌شود که در یک فاصله زمانی ۱۲۰ ثانیه‌ای از ۵ دور بر ثانیه به ۴۰ دور بر ثانیه برسد (شکل ۳-۴). مدت زمانی که حیوان می‌تواند بر روی میله‌ها قدم بزند معیاری از توانایی اجرای حرکتی حیوان می‌باشد. این آزمون در ۳ روز پشت سر هم هر روز ۲ بار، با فاصله زمانی حداقل ۱ ساعت (مجموعاً ۶ جلسه) انجام می‌شود. داده‌های آزمون روتارود براساس معیار ناحیه زیر منحنی (area under the curve (AUC و براساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$AUC = \text{time on the rod (s)} \times [\text{time on the rod (s)} \times 0.44 / 2]$$

$$0.44 = \text{میزان شتاب سرعت چرخش میله گردان دستگاه در ثانیه}$$

حیوانات سالم پس از چند جلسه به خوبی یاد می‌گیرند که بر روی میله‌ها در تمام مدت آزمون قدم زده، تعادل خود را حفظ کرده و از افتادن خود از دستگاه جلوگیری نمایند. از طرف دیگر حیوانات با اختلالات حرکتی مثلاً حیوانات پارکینسونی و یا حیوانات مبتلا به آتاکسیا در انجام این آزمون ضعیف عمل کرده و اجرای آن را یاد نمی‌گیرند و یا دیر یاد می‌گیرند. اثرات درمان و یا پیش‌درمان‌های مختلف بر روی این بیماری‌ها در این آزمون آشکار خواهد شد.



شکل ۳-۴: تصویری از دستگاه روتارود ۴ کاناله

۳-۷- روش جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل داده‌ها:

تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس نرم‌افزار اکسل بیان شده است. همچنین در تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها چنانچه داده‌ها از توزیع نرمال تبعیت نمایند از آزمون آنالیز واریانس به همراه آزمون تعقیبی توکی استفاده خواهد شد. چنانچه داده‌ها از توزیع نرمال تبعیت ننمایند از آزمون کروسکال‌والیس استفاده خواهد شد و سطح معنی‌دار کمتر از ۰,۰۵ محاسبه شد.

فصل چهارم

نتایج و یافته‌ها

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر مهارکننده 4-AP در پیشگیری از بیماری پارکینسون بود.

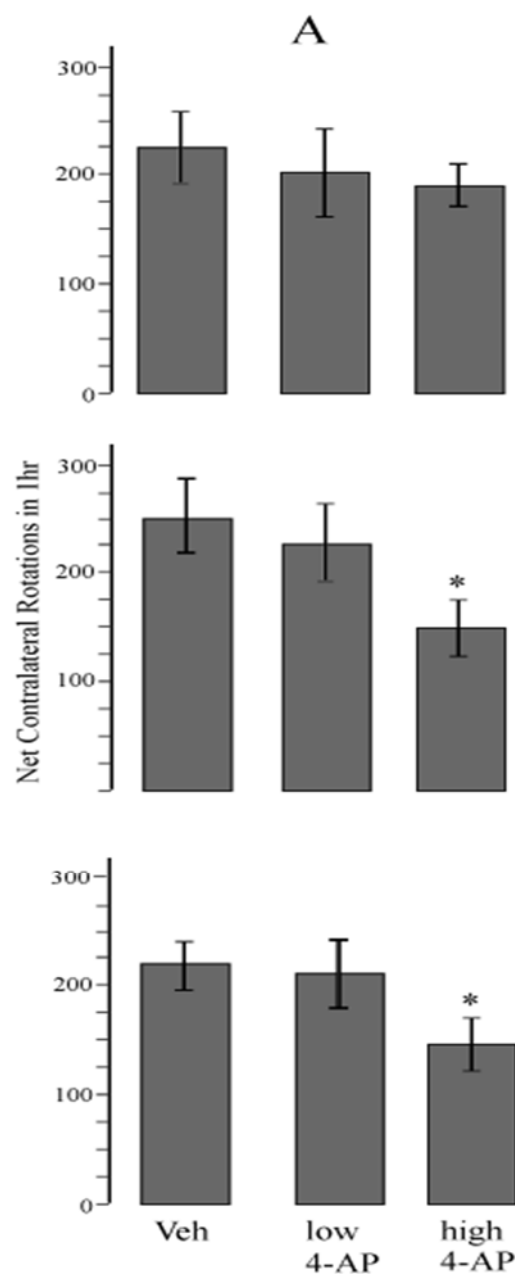
از آنجایی که مهار کانال‌های پتاسیمی سبب افزایش تحریک‌پذیری و فعالیت الکتریکی نورون‌ها می‌شود که می‌تواند منجر به بروز تشنج شود (۸۰)، قبل از شروع مطالعه آزمایشاتی برای یافتن دوز تحت تشنجی داروی 4-AP صورت گرفت. تجویز درون‌صفافی داروی 4-AP در دوزهای بالاتر از ۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن سبب بروز تشنج و مرگ در موش‌های صحرایی گردید. ولی دوزهای ۱ و دوز ۰,۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن، هیچگونه عوارض قابل مشاهده‌ای بر روی موش‌ها نداشت. از این رو در این تحقیق بالاترین دوز بکار رفته دوز ۰,۵ و ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن بود.

۱-۴ نتایج آزمون چرخش القا شده با آپومورفین:

موش‌های تمامی گروه‌ها درجه‌های مختلفی از چرخش القا شده با آپومورفین را نشان دادند که نشان می‌دهد، پیش‌درمان با 4-AP نتوانست از ایجاد پارکینسونیسم القاء شده توسط سم 6-OHDA، جلوگیری کند. لکن تفاوت‌هایی بین گروه‌ها در شدت چرخش‌ها مشاهده شد، که نشان می‌دهد 4-AP نتوانسته است به میزان قابل توجهی بر شدت پارکینسونیسم ایجاد شده اثر گذارد.

۱-۱-۴ نتیجه آزمون چرخش القا شده با آپومورفین برای گروه‌های حاد:

در گروه سالین (veh) تعداد چرخش‌ها در آزمون‌های اول تا سوم پس از جراحی به ترتیب در اولین آزمون $8/13 \pm 223/38$ در دومین آزمون تعداد چرخش‌ها $9/95 \pm 220/25$ و در سومین آزمون تعداد چرخش‌ها $5/32 \pm 217/13$ بود به گونه‌ای که تعداد چرخش‌ها در این سه آزمون تغییر قابل ملاحظه‌ای نکرد. 4-AP در دوز زیاد اگر چه در اولین آزمون چرخشی پس از جراحی (شکل ۱-۴ پانل بالا)، اثر معنی‌داری بر شدت چرخش‌ها نداشت، ولی در دومین و سومین آزمون چرخشی پس از جراحی (شکل ۱-۴ پانل وسط و پایین)، به میزان معنی‌داری از شدت چرخش‌ها کاست. در گروه 4-AP مدل حاد با میزان زیاد، شدت چرخش‌ها در دومین آزمون پس از جراحی ۴۰ درصد و در سومین آزمون حدود ۳۰ درصد کمتر از گروه سالین (veh) بود (شکل شماره ۱-۴). در گروه‌های مدل حاد، اگرچه تجویز دوز کم 4-AP اندکی از شدت چرخش‌ها کاست، ولی این اثر از نظر آماری معنی‌دار نبود. (شکل ۱-۴)



شکل ۴-۱: نمودار نتایج آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین در گروه‌های مدل حاد نشان داده شده است. شکل‌های بالا تا

پایین به ترتیب نتایج آزمون را در اولین، دومین و سومین آزمون پس از جراحی نشان می‌دهند.

4-AP زیاده در اولین آزمون چرخشی اثر معنی‌داری بر شدت چرخش‌ها نداشت ولی در دومین و سومین آزمون به میزان

معنی‌داری از شدت چرخش‌ها کاست.

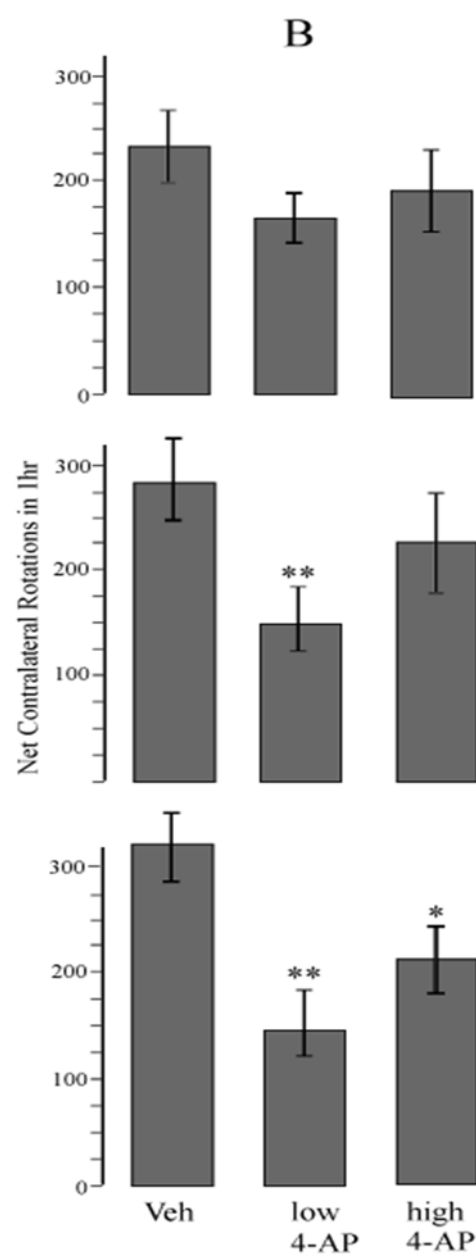
veh: گروه سالیین Low 4-AP: دوز کم 4-AP (0.5mg/kg). high 4-AP: دوز زیاد 4-AP (1mg/kg).

*: $P < 0.05$ و **: $P < 0.01$

۴-۱-۲ نتیجه آزمون چرخش القاشده با آپومورفین برای گروه‌های مزمن:

در گروه سالین مزمن، تعداد چرخش‌ها در آزمون‌های پس از جراحی به تدریج افزایش یافت. به این صورت که تعداد چرخش‌ها در اولین آزمون $6/76 \pm 228/25$ ، در دومین آزمون تعداد چرخش‌ها $6/56 \pm 246/5$ و در سومین آزمون تعداد چرخش‌ها $7/28 \pm 300/15$ بود.

در گروه‌های مدل مزمن، در اولین آزمون (شکل ۴-۲ پانل بالا) اثر دوز کم 4-AP معنی‌دار نبود. در دومین آزمون (شکل ۴-۲ پانل وسط) میزان کم 4-AP سبب کاهش شدید و معنی‌دار شدت چرخش‌ها (حدود ۵۰ درصد، $P < 0/01$) نسبت به گروه سالین شد. در سومین آزمون (شکل ۴-۲ پانل پائین) نیز، میزان کم 4-AP سبب کاهش شدید و معنی‌دار شدت چرخش‌ها (حدود ۶۰ درصد، $P < 0/01$) نسبت به گروه سالین گردید. اثر دوز زیاد 4-AP در کاهش شدت چرخش‌ها در سومین آزمون نیز معنی‌دار بود (حدود ۳۰ درصد) ولی این اثر ضعیف‌تر از میزان کم بود. در گروه‌های مزمن 4-AP به ویژه در گروه میزان کم، این افزایش در شدت چرخش‌ها مشاهده نشد (شکل ۴-۲).



شکل ۴-۲: نمودار نتایج آزمون چرخش القاء شده با اپومورفین در گروه‌های مدل مزمن نشان داده شده است.

شکل‌های بالا تا پایین به ترتیب نتایج آزمون را در اولین، دومین، و سومین آزمون پس از جراحی نشان می‌دهند.

4-AP کم در اولین آزمون اثرش معنی‌دار نبود ولی در دومین و سومین آزمون سبب کاهش شدید و معنی‌دار شدت

چرخش‌ها نسبت به گروه سالین شد.

*: $P < 0.05$ و **: $P < 0.01$

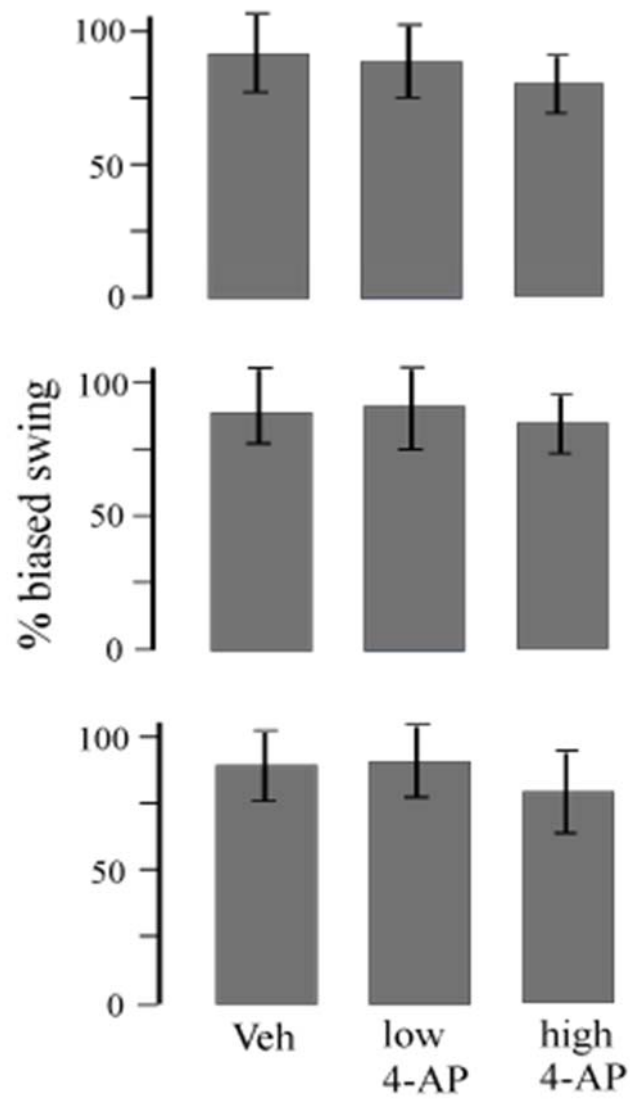
۴-۲ نتیجه آزمون پیچش بدن بالا رفته (EBST):

تعداد پیچش‌ها از ۱ تا ۸ پیچش متفاوت بود. ولی تقریباً پیچش همه موش‌ها به سمت مقابل محل تزریق سم بود. در زیر نتایج به صورت درصد بیان شده‌اند.

۴-۲-۱ نتیجه آزمون EBST برای گروه‌های حاد:

در آزمون EBST اگرچه 4-AP در میزان زیاد اندکی از انحراف در پیچش‌ها نسبت به گروه سالین کاست، ولی در مجموع اثر 4-AP (دوز کم و دوز زیاد) بر آزمون EBST در مدل حاد قابل ملاحظه و معنی‌دار نبود. (شکل ۴-۳)

A



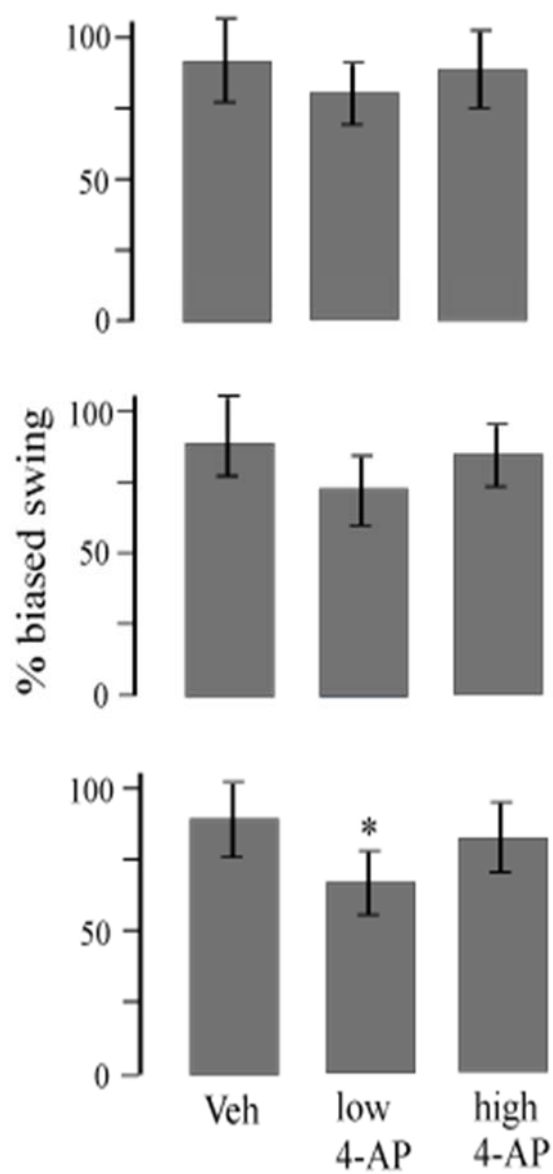
شکل ۴-۳: نمودار نتایج آزمون پیچش بدن بالارفته (EBST) در گروه‌های مدل حاد نشان داده شده است. شکل‌های بالا تا پایین به ترتیب نتایج آزمون را در اولین، دومین، و سومین آزمون پس از جراحی نشان می‌دهند. در مجموع اثر 4-AP (دوز کم و دوز زیاد) قابل ملاحظه و معنی‌دار نبود.

*: $P < 0.05$

۴-۲-۲ نتیجه آزمون EBST برای گروه‌های مزمن:

در گروه‌های مدل مزمن اثر 4-AP تا اندازه‌ای بارزتر بود. میزان کم 4-AP سبب کاهش در شدت انحراف پیش‌ها در هر سه آزمون پس از جراحی شد، که این کاهش در سومین آزمون نسبت به گروه سالین معنی‌دار بود (شکل ۴-۴). همچنین اثر دوز زیاد 4-AP قابل ملاحظه و معنی‌دار نبود (شکل ۴-۴).

B



شکل ۴-۴: نمودار نتایج آزمون پیچش بدن بالارفته (EBST) در گروه‌های مدل مزمن نشان داده شده است. شکل‌های بالا تا

پایین به ترتیب نتایج آزمون را در اولین، دومین و سومین آزمون پس از جراحی نشان می‌دهند.

میزان کم 4-AP سبب کاهش انحراف پیچش‌ها شد که این کاهش در سومین آزمون بارزتر بود.

*: $P < 0.05$

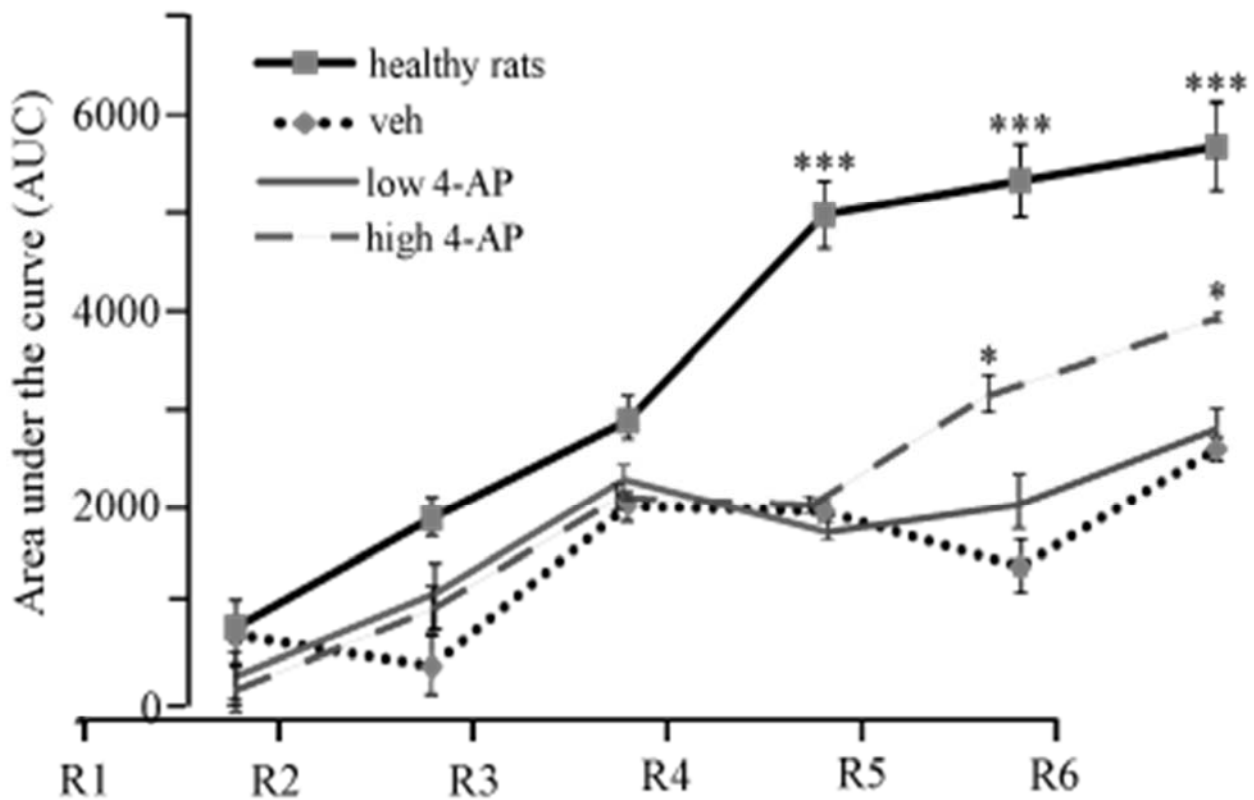
۳-۴ نتایج آزمون روتارد:

در آزمون روتارد توانایی یادگیری حرکتی موش‌های صحرایی بررسی می‌شود. از آنجایی که عقده‌های قاعده‌ای نقش مهمی در یادگیری حرکتی ایفا می‌نمایند، اختلال در عمل آن‌ها (مثلاً در بیماری پارکینسون) سبب اختلال در یادگیری حرکتی می‌شود که با آزمون روتارد قابل تشخیص می‌باشد. در این آزمون دو پارامتر حائز اهمیت می‌باشد: ۱- زمان ماندن بر میله چرخان، که هر چه بالاتر باشد نشان دهنده یادگیری بهتر در موش می‌باشد. در این مطالعه AUC زمان ماندن بر میله چرخان را نشان می‌دهد. ۲- الگوی یادگیری به این معنی که در صورت یادگیری زمان ماندن بر میله چرخان (AUC) در جلسات متوالی به تدریج افزایش می‌یابد. در آزمون روتارد موش‌های سالم به سرعت نحوه قدم‌زدن در دستگاه روتارد را آموختند، به طوری که در جلسه چهارم آزمون، به حداکثر زمان ماندن بر میله چرخان نزدیک شدند و در جلسه ششم به حداکثر زمان رسیدند. در موش‌های پارکینسونی (موش‌های گروه سالین veh) اگرچه در جاتی از یادگیری مشاهده شد، ولی این یادگیری بسیار ضعیف بود و زمان ماندن تغییراتی را در جلسه‌های مختلف آزمون نشان داد. مثلاً در گروه سالین (شکل ۵) AUC در جلسه ۵ (R5) کمتر از آن در جلسه ۳ و ۴ بود.

۴-۳-۱ نتیجه آزمون روتارد برای گروه‌های حاد:

در گروه‌های مدل حاد AUC (متغیر وابسته به زمان ماندن، در میله چرخان روتارد) در موش‌های گروه سالین حاد (veh) و در جلسه‌های ۴، ۵ و ۶ بسیار کمتر از زمان ماندن در موش‌های سالم، و تفاوت بین این دو گروه معنی‌دار بود ($P < 0.001$). با تزریق دوز زیاد 4-AP، حرکت موش‌ها اندکی بهبود یافت؛ به طوری که زمان ماندن در جلسه‌های ۵ و ۶، به میزان معنی‌داری بیشتر از گروه سالین، و گروه حاد با میزان کم 4-AP بود ($P < 0.05$) (شکل ۴-۵). همین‌طور تزریق میزان کم 4-AP، اثر مشخصی نداشت و الگوی یادگیری و زمان ماندن بر میله چرخان در گروه حاد کم 4-AP، بسیار نزدیک به گروه سالین بود (شکل ۴-۵).

A



شکل ۴-۵: نمودار نتایج آزمون روتارد در گروه‌های مدل حاد نشان داده شده است. AUC متغیری وابسته به زمان ماندن

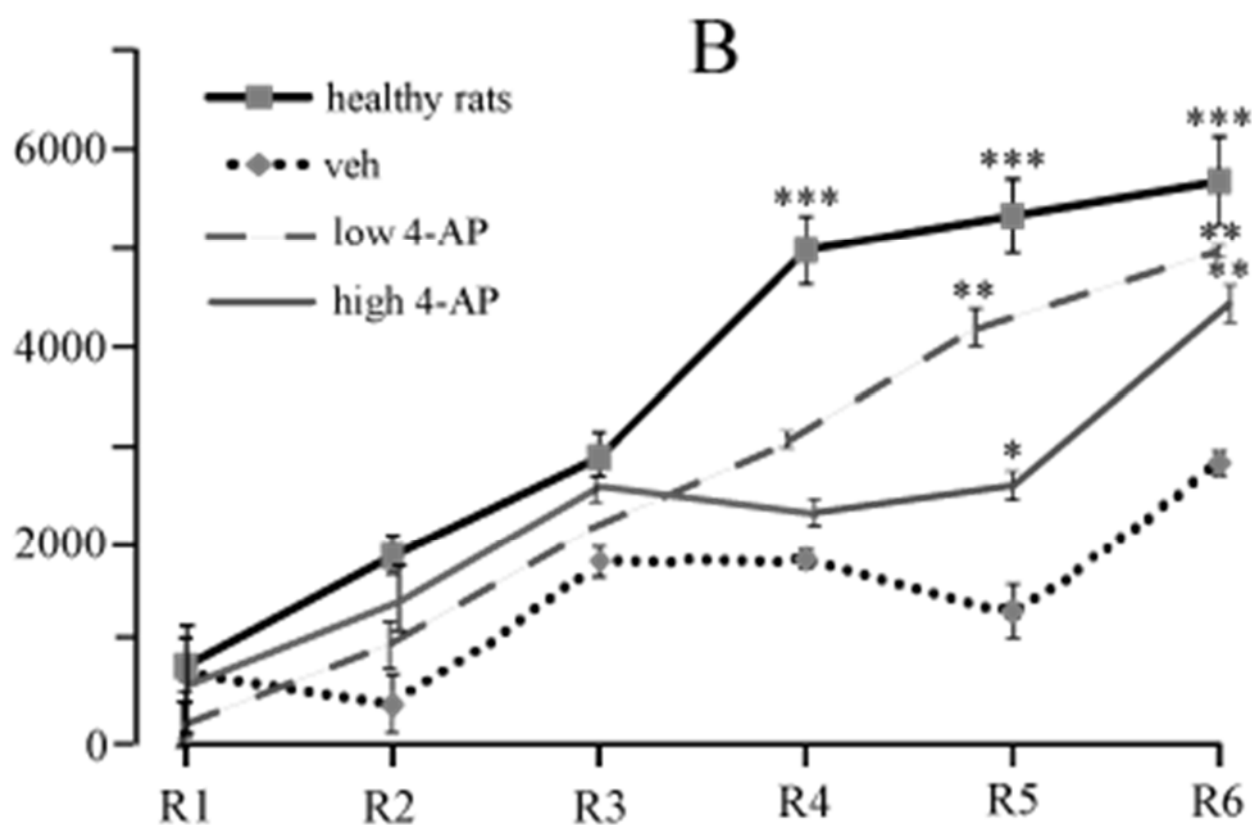
در میله چرخان دستگاه روتارد می‌باشد. اثر دوز کم 4-AP معنی‌دار نبود ولی دوز زیاد آن معنی‌دار بود.

P<0.01 :**, P<0.05 :*

P<0.001 :***

۴-۳-۲ نتیجه آزمون روتارد برای گروه‌های مزمن:

در گروه 4-AP با میزان کم، حرکت موش‌ها بسیار بهتر از گروه سالین بود و الگوی یادگیری به موش‌های سالم نزدیک بود. AUC جلسه‌های ۵ و ۶ به صورت معنی‌داری در گروه‌های 4-AP مزمن بیشتر از گروه سالین بود ($P < 0.01$) (شکل ۴-۶). در گروه 4-AP با میزان زیاد، زمان ماندن در جلسه‌های ۵ و ۶ بیشتر از گروه سالین، ولی الگوی یادگیری به موش‌های پارکینسونی نزدیک‌تر بود (شکل ۴-۶).



شکل ۴-۶: نمودار نتایج آزمون روتارد در گروه‌های مدل مزمن نشان داده شده است. AUC متغیری وابسته به زمان ماندن در میله چرخان دستگاه روتارد می‌باشد. اثر 4-AP کم و زیاد در جلسه‌های ۵ و ۶ معنی‌دار بود و بیشتر از گروه سالین بود.

*: $P < 0.05$ ، **: $P < 0.01$

***: $P < 0.001$

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که در نوع حاد مدل 6-OHDA بیماری پارکینسون، پیش‌درمان با مهارکننده کانال‌های پتاسیمی 4-AP در دوز بالا و تحت تشنجی (یک میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن) می‌تواند سبب کاهش معنی‌دار شدت چرخش‌های القاشده با آپومرفین شود و تا اندازه‌ای یادگیری حرکتی درآزمون روتارد را بهبود بخشد. تجویز 4-AP با دوز کم (۵/۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن) اثر قابل ملاحظه‌ای بر علایم رفتاری بیماری نداشت. از طرف دیگر در نوع مزمن مدل اگرچه دوز بالای 4-AP اثر معنی‌داری بر کاهش شدت چرخش‌های القاشده با آپومرفین و بهبود یادگیری حرکتی درآزمون روتارد داشت، ولی اثر دوز کم این مهارکننده بسیار قوی‌تر و بارزتر بود. 4-AP در این دوز نه تنها سبب کاهش معنی‌دار شدت چرخش‌های القاءشده با آپومرفین و بهبود یادگیری حرکتی گردید بلکه سبب کاهش انحراف پیچش‌ها درآزمون EBST نیز شد.

این نتایج نشان می‌دهند که پیش‌درمان با 4-AP می‌تواند تا اندازه‌ای شدت علایم رفتاری پارکینسون القاءشده با سم 6-OHDA را کاهش دهد. نوع حاد مدل 6-OHDA بیماری پارکینسون بر اثر تجویز سم به ناحیه MFB و یا هسته جسم سیاه، ایجاد می‌شود. در این حالت، سم درعرض ۲ یا ۳ روز سبب مرگ گسترده نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم هسته جسم سیاه می‌شود. نوع مزمن مدل 6-OHDA بیماری پارکینسون بر اثر تجویز سم به ناحیه استریاتوم مغز جلویی ایجاد می‌شود. در این حالت سم درعرض ۵ تا ۱۰ روز سبب مرگ نورون‌های دوپامینرژیک هسته جسم سیاه می‌شود (۸۱).

مرگ گسترده نورون‌های دوپامینرژیک درمدت نسبتاً کوتاه در مدل حاد نیاز به دوز بالای 4-AP برای اثربخش بودن را توجیه می‌کند. این یافته مطابق با آزمایشاتی بود که دکتر حقدوست و همکارانشان در رابطه با درمان و کاهش شدت علایم رفتاری بیماری پارکینسون درموش‌های صحرایی در سال ۲۰۱۱ انجام

دادند و دریافتند دوز کم 4-AP (۲/ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن) و متوسط (۵/ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن) در درمان بیماری پارکینسون اثری نداشت ولی دوز بالا (۱ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن) موثر بود (۲۶). از طرف دیگر مدل مزمن بیش تر شبیه ایجاد بیماری پارکینسون در انسان می باشد (۸۱). بنابراین بر اساس داده های این تحقیق در صورت استفاده از 4-AP برای درمان بیماری پارکینسون در انسان دوزهای پایین آن توصیه می شود.

بر اساس نتایج این تحقیق پیش درمان با 4-AP می تواند علائم رفتاری پارکینسونیسم القاء شده توسط سم 6-OHDA را کاهش دهد. از این رو داده های این تحقیق نشان می دهند که مهارکننده کانال های پتاسیمی 4-AP می تواند اثرات ضد پارکینسونی داشته باشد. از این رو این تحقیق نتایج محققین مختلف مبنی بر اثربخش بودن 4-AP در درمان بیماری های نورودژنراتیو مختلف را تایید می کند.

گودرزی و همکاران در سال ۲۰۱۰ دریافتند 4-AP می تواند تخریب نورونی ناشی از سم ۳-acetylpyridine در موش های مبتلا به آتاکسیا اپیسودیک نوع ۲ جلوگیری کند (۱۶). STRUPP و همکاران در سال ۲۰۰۷ دریافتند 4-AP می تواند فرکانس حملات را در بیماران مبتلا به آتاکسیا اپیسودیک نوع ۲ کاهش دهد و باعث بهبود کیفیت زندگی این بیماران گردد. در این تحقیق مشخص گردید که کاربرد 4-AP از حملات این بیماری جلوگیری کرده و پی گیری بیماران در عرض ۶ ماه نشان داد که حملات بیماری نیز متوقف شده است (۶۵).

Kalla R و همکاران در سال ۲۰۱۱ دریافتند که مصرف ۱۰ میلی گرم 4-AP و ۳ و ۴ دی آمینوپیریدین در بیماران مبتلا به نیستاگموس باعث بهبود عملکرد و شدت تحریک پذیری سلول های پورکنز مخچه که واسطه عدم لرزش کره چشم است می شود (۶۶). Gary Leung و همکاران در سال ۲۰۱۱ دریافتند که 4-

AP می‌تواند هدایت ایمپالس را در آکسون‌های آسیب‌دیده طناب نخاعی در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس (MS) افزایش دهد و به عنوان یک دارو در درمان این بیماری استفاده شود (۲۰). WU و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند، 4-AP با مهار کردن کانال‌های پتاسیم می‌تواند انتقال عصبی-عضلانی را در بیماران مبتلا به میاستنی گراویس بهبود بخشد. همچنین مشتقات آمینوپیریدینی می‌تواند کانال‌های کلسیمی فعال و لتاژ بالا را (HVACCS) را به رها کردن نوروترانسمیترهای مستقل کانال‌های پتاسیمی وادار کند (۷۴) Franciosi S و همکاران در سال ۲۰۰۶ دریافتند که دوزهای مختلف 4-AP روی آمیلوئید بتا ۱ در میکروگلیای انسان می‌تواند به عنوان یک استراتژی درمانی برای بیماران مبتلا به آلزایمر بکار گرفته شود (۲۲). (آمیلوئید بتا ۱، پروتئین غشایی است که به میزان زیادی در سیستم عصبی بیان شده و در یادگیری و بقاء سلولی دارای نقش می‌باشد، این پروتئین می‌تواند از طریق فعال کردن جریان پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت بالا سبب سمیت نورونی گردد. و تصوری شود که اختلال در این پروتئین ممکن است در بیماری آلزایمر نقش داشته باشد).

گزارش‌ها نشان داده‌اند که یک ارتباط مثبت بین مرگ سلول‌های دوپامینرژیک هسته جسم سیاه در بیماری پارکینسون و شدت علائم رفتاری در مدل حیوانی 6-OHDA وجود دارد. Yuan H. و همکاران در سال ۲۰۰۵ تاثیر تزریق سم 6-OHDA را به استریاتوم و به MFB موش‌های صحرایی مقایسه کردند، و دریافتند ضایعات MFB مرحله نهایی بیماری پارکینسون هستند، در حالیکه ضایعات استریاتوم حاد و پیشرونده نیستند. آنها همچنین بیان کردند آزمون چرخشی، معتبرترین آزمون در ارزیابی شدت این مدل از بیماری پارکینسون می‌باشد که می‌تواند آسیب‌های نسبی و یا تقریباً کامل در هسته جسم سیاه را تشخیص دهد. در این آزمون دامنه چرخش‌ها به درجه ضایعه و تخریب وابسته است (۸۲). Lancu R و همکاران در سال ۲۰۰۵ دریافتند که ضایعات 6-OHDA یکطرفه قابل توجه و پایداری را در موش‌ها میتوان بوجود آورد

و این ضایعات را با استفاده از آزمون‌های مختلف ارزیابی کرد که شاید به وسیله آنها در آینده به علت بیماری پارکینسون پی‌بیریم. همینطور نشان دادند آزمون روتارود میتواند بهترین پیش‌بینی را از مرگ سلول‌های دوپامینرژیک در مقایسه با تست چرخشی و EBST ارائه دهد، و زمان ماندن بر گردونه دستگاه روتارد نسبت عکس با آسیب سلولی در این هسته دارد (۸۳). همچنین Borlongan CV و همکارش در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که آزمون EBST آزمون معتبری در اندازه‌گیری اعمال حرکتی میانجی شده بوسیله دوپامین می‌باشد. بر این اساس ما می‌توانیم ادعا کنیم که پیش‌درمان با 4-AP سبب کاهش مرگ نورونی نورون‌های دوپامینرژیک در هسته جسم سیاه توسط سم 6-OHDA شده است (۷۸).

Hernandez-Enriquez و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نقش جریانات یون پتاسیم را روی مرگ سلولی و کاهش حجم آپوپتوتیک در نورون‌های گرانولار مخچه‌ای کشت داده شده بررسی کردند، آنها دریافتند نورون‌های گرانولار مخچه‌ای (CGN) در ۳ حالت دچار آپوپتوز و کاهش حجم آپوپتوتیک می‌شوند: تحت تاثیر استارواسپورین‌ها، تحت تاثیر کامپتوتیسین (CPT) یا وقتی که سلول‌ها از پتاسیم خارج سلولی بالا (mM) ۲۵ به پتاسیم خارج سلولی کم (mM) ۵ منتقل می‌شوند. سپس آنها دریافتند دو نوع مختلف مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی یعنی سزیم و TEA از کاهش حجم آپوپتوتیک و آپوپتوز نورون‌های (CGN) جلوگیری می‌کند (۶۹).

Grishin A و همکارانش در سال ۲۰۰۵ دریافتند مهار کانال‌های پتاسیمی در آنتروسیت‌های روده‌ای سبب تضعیف آپوپتوز می‌شود. جریان پتاسیم در روند آپوپتوز سلول‌های آنتروسیت ضروری است و به زودی اتفاق می‌افتد. آنها دریافتند استفاده از مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی مانند 4AP، TEA استروماتوکسین از شکسته شدن DNA، فعالیت کاسپازها و رها شدن سیتوکروم C از میتوکندری و کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و در نتیجه آپوپتوز جلوگیری می‌کند (۶۲).

4-AP مهارکننده کلاسیک کانال‌های پتاسیمی سریع است، که بر کانال‌های پتاسیمی زیرخانواده KV1، KV3، KV4 و با آفینیته کم‌تر KV2 اثر می‌کند (۵۸، ۸۴). نشان داده شده است که کانال‌های Kv در مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) نورون‌های دوپامینرژیک سهمیم هستند (۲۴، ۲۵). به طوری که در فرآیند آپوپتوز خروج سریع و ناگهانی یون‌های پتاسیم از داخل سلول اتفاق می‌افتد میزان K^+ داخل سلولی به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد که باعث گسیختگی DNA، فعال‌شدن کاسپازها، آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری‌ها و کاهش پتانسیل غشای میتوکندری‌ها و در نهایت آپوپتوز اتفاق می‌افتد. ردمن و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که سم 6-OHDA جریانات یونی وابسته به کانال‌های پتاسیمی را در سلول‌های مزانتريک تا دو برابر افزایش می‌دهد که این افزایش جریان پتاسیم تقریباً با مرگ ۵۰ درصد از نورون‌های دوپامینرژیک همراه بوده است. آنها همچنین نشان دادند که سم 6-OHDA سبب مرگ سلولی وابسته به کانال‌های Kv القایی توسط استرس اکسیداتیو در نورون‌های قشری می‌شود. همچنین آنها نشان دادند که سمیت ناشی از 6-OHDA را با استفاده از آنتاگونیست‌های کانال‌های پتاسیمی می‌توان خنثی کرد (۸۵). مکانیسم‌های دیگری برای اثرات حفاظت نورونی 4-AP پیشنهاد شده است. این مهارکننده سبب فعال شدن گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA و غیر NMDA شده و از این طریق موجب افزایش آزادسازی دوپامین در استریاتوم می‌شود (۸۶).

۲-۵- نتیجه گیری:

بطور کلی این تحقیق نشان داد، که مهارکننده کانال‌های پتاسیمی، 4-آمینوپیریدین می‌تواند اثرات حفاظت نورونی برای نورون‌های دوپامینرژیک هسته جسم سیاه در برابر سم 6-OHDA داشته باشد. این اثر وابسته به دوز بود و در شرایطی که مرگ نورونی گسترده و سریع وجود داشته دوزهای نسبتاً بالا و در شرایط مزمن، دوزهای پایین‌تر موثر بود. با توجه به اینکه بیماری پارکینسون در انسان یک بیماری نورودژنراتیو مزمن است، کاربرد 4-AP در بیماران پارکینسونی به ویژه در مراحل اول بیماری می‌تواند سبب کاهش و یا آهسته نمودن مرگ نورون‌های دوپامینرژیک شود و در کاهش پیشرفت علائم بیماری موثر باشد.

۳-۵- پیشنهادات:

- .1 Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003;39(6):889-909.
- .2 Przedborski S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 2005;11:S3-S7.
- .3 Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2009;1792(7):643-50.
- .4 Mathie A, Woollorton JR, Watkins CS. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1998;30(1):13-24.
- .5 Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, et al. Molecular diversity of K⁺ channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;868(1):233-55.
- .6 Skryma RN, Prevarskaya NB, Dufy-Barbe L, Audin J, Dufy B. Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: Involvement in cell proliferation. *The Prostate*. 1997;33(2):112-22.
- .7 Woodfork KA, Wonderlin WF, Peterson VA, Strobl JS. Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. *Journal of cellular physiology*. 1995;162(2):163-71.
- .8 Yu SP, Yeh CH, Gottron F, Wang X, Grabb MC, Choi DW. Role of the Outward Delayed Rectifier K⁺ Current in Ceramide-Induced Caspase Activation and Apoptosis in Cultured Cortical Neurons. *Journal of neurochemistry*. 1999;73(3):933-41.
- .9 Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2000;279(5):F793-F801.
- .10 Wang X, Xiao AY, Ichinose T, Yu SP. Effects of tetraethylammonium analogs on apoptosis and membrane currents in cultured cortical neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000;295(2):524-30.
- .11 Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, Mattson MP. Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted β -amyloid-precursor protein. 1996.
- .12 Wang G, Zeng J, Ren R, Chen S. Potassium channels in the basal ganglia: promising new targets for the treatment of Parkinson's disease. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2007;13:3825-38.
- .13 Edgerton JR, Reinhart PH. Distinct contributions of small and large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels to rat Purkinje neuron function. *The Journal of physiology*. 2003;548(1):53-69.
- .14 Cavelier P, Pouille F, Desplantez T, Beekenkamp H, Bossu JL. Control of the propagation of dendritic low-threshold Ca²⁺ spikes in Purkinje cells from rat cerebellar slice cultures. *The Journal of physiology*. 2002;540(1):57-72.
- .15 Yazdi HH, Janahmadi M, Behzadi G. The role of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in the modulation of 4-aminopyridine-induced burst firing in rat cerebellar Purkinje cells. *Brain research*. 2007;1156:59-66.
- .16 Goudarzi I, Kaffashian M, Shabani M, Haghdoost-Yazdi H, Behzadi G, Janahmadi M. In vivo 4-aminopyridine treatment alters the neurotoxin 3-acetylpyridine-induced plastic changes in intrinsic electrophysiological properties of rat cerebellar Purkinje neurones. *European journal of pharmacology*. 2010;642(1):56-65.
- .17 Strupp M, Kalla R, Dichgans M, Freilinger T, Glasauer S, Brandt T. Treatment of episodic ataxia type 2 with the potassium channel blocker 4-aminopyridine. *Neurology*. 2004;62(9):1623-5.
- .18 Glasauer S, Strupp M, Kalla R, Büttner U, Brandt T. Effect of 4-aminopyridine on upbeat and downbeat nystagmus elucidates the mechanism of downbeat nystagmus. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1193:1039-05.
- .19 Glasauer S, Kalla R, Büttner U, Strupp M, Brandt T. 4-aminopyridine restores visual ocular motor function in upbeat nystagmus. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2005;76(3):451-3.

- .20 Leung G, Sun W, Brookes S, Smith D, Shi R. Potassium channel blocker, 4-aminopyridine-3-methanol, restores axonal conduction in spinal cord of an animal model of multiple sclerosis. *Experimental neurology*. 2011;227(1):232-5.
- .21 Andreani A, Leoni A, Locatelli A, Morigi R, Rambaldi M, Pietra C, et al. 4-Aminopyridine derivatives with anti-amnesic activity. *European journal of medicinal chemistry*. 2000;35(1):77-82.
- .22 Franciosi S, Ryu JK, Choi HB, Radov L, Kim SU, McLarnon JG. Broad-spectrum effects of 4-aminopyridine to modulate amyloid β 1-42-induced cell signaling and functional responses in human microglia. *The Journal of neuroscience*. 2006;26(45):11652-64.
- .23 Ogita K, Okuda H, Watanabe M, Nagashima R, Sugiyama C, Yoneda Y. In vivo treatment with the K⁺ channel blocker 4-aminopyridine protects against kainate-induced neuronal cell death through activation of NMDA receptors in murine hippocampus. *Neuropharmacology*. 2005;48(6):810-21.
- .24 Baranauskas G, Tkatch T, Surmeier DJ. Delayed rectifier currents in rat globus pallidus neurons are attributable to Kv2. 1 and Kv3. 1/3.2 K⁺ channels. *The Journal of neuroscience*. 1999;19(15):6394-404.
- .25 Wang Y, Yang P-l, Tang J-f, Lin J-f, Cai X-h, Wang X-t, et al. Potassium channels: possible new therapeutic targets in Parkinson's disease. *Medical hypotheses*. 2008;71(4):546-50.
- .26 Haghdoust-Yazdi H, Faraji A, Fraidouni N, Movahedi M, Hadibeygi E, Vaezi F. Significant effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium in the treatment of 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease. *Behavioural brain research*. 2011;223(1):70-4.
- .27 Ebadi M, Srinivasan SK, Baxi MD. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*. 1996;48(1):1-19.
- .28 John E. Guyton and Hall textbook of medical physiology. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.
- .29 Mullin S, Schapira AH. Pathogenic mechanisms of neurodegeneration in Parkinson disease. *Neurologic clinics*. 2015;33(1):1-17.
- .30 Schapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement disorders*. 2011;26(6):55-1049:({
- .31 Armstrong M, Daly A, Cholerton S, Idle J, Bateman D. Mutant debrisoquine hydroxylation genes in Parkinson's disease. *The Lancet*. 1992;339(8800):1017-8.
- .32 Schapira AH. Etiology of Parkinson's disease. *Neurology*. 2006;66(10 suppl 4):S10-S23.
- .33 Halliday GM, McCann H. The progression of pathology in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1184(1):188-95.
- .34 Davis KL. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress: an official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
- .35 Yelnik J. Functional anatomy of the basal ganglia. *Movement disorders*. 2002;17(S3):S15-S21.
- .36 Yasmin QS, Banu LA, Rahamn MF, Hossain S, Akhter Z. Impact of use of illustration in the presentation of Neuroanatomy through the analyses of the illustration in the Neuroanatomy text books commonly used by the medical postgraduates of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Anatomy*. 2013;10(1):27-31.
- .37 Clarke PG, Blaser P, Catsicas S. Neurotrophic theory. *Trends in Neurosciences*. 1989;12(12):494-5.
- .38 Emmi A, Rajabi H, Stewart J. Behavioral and neurochemical recovery from partial 6-hydroxydopamine lesions of the substantia nigra is blocked by daily treatment with D1/D5, but not D2, dopamine receptor antagonists. *The Journal of neuroscience*. 1997;17(10):3840-6.
- .39 Gerlach M, Riederer P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *Journal of neural transmission*. 1996;103(8):1041-987:(9-
- .40 Gassen M, Youdim M. Free radical scavengers: chemical concepts and clinical relevance: Springer; 1999.

- .41 Kane JR, Ciucci MR, Jacobs AN, Tews N, Russell JA, Ahrens AM, et al. Assessing the role of dopamine in limb and cranial-oromotor control in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of communication disorders*. 2011;44(5):529-37.
- .42 Groc L, Bezin L, Foster JA, Jiang H, Jackson TS, Weissmann D, et al. Lipid peroxidation-mediated oxidative stress and dopamine neuronal apoptosis in the substantia nigra during development. *Neurochemistry international*. 2001;39(2):127-33.
- .43 Garrett BE, Griffiths RR. The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1997;57(3):533-41.
- .44 GEBICKE-HAERTER P, GERLACH, M; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm*. 1996;103:987-1041.
- .45 Logroscino G, Marder K, Cote L, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Dietary lipids and antioxidants in Parkinson's disease: a population-based, case-control study. *Annals of neurology*. 1996;39(1):89-94.
- .46 Dexter D, Carter C, Wells F, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 1989;52(2):381-9.
- .47 Carlsson A, Rosengren E, Bertler Å, Nilsson J. Effect of reserpine on the metabolism of catecholamines. *Psychotropic drugs*. 1957;6:363-72.
- .48 Barnum CJ, Tansey MG. Modeling neuroinflammatory pathogenesis of Parkinson's disease. *Progress in brain research*. 2010;184:113-32.
- .49 Hauber W, Schmidt WJ. The NMDA antagonist dizocilpine (MK-801) reverses haloperidol-induced movement initiation deficits. *Behavioural brain research*. 1990;41(2):161-6.
- .50 Pereira E, Aziz T. Parkinson's disease and primate research: past, present, and future. *Postgraduate medical journal*. 2006;82(967):293-9.
- .51 Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* . 18-308:(4)24;2002
- .52 Lotharius J, Dugan LL, O'malley KL. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *The Journal of neuroscience*. 1999;19(4):1284-93.
- .53 Glinka Y, Gassen M, Youdim M. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Advances in Research on Neurodegeneration: Springer*; 1997. p. 55-66.
- .54 Hudson JL, van Horne CG, Strömberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, et al. Correlation of apomorphine-and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain research*. 1993;626(1):167-74.
- .55 Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: programmed cell death. 2013.
- .56 Haghdoost-Yazdi H, Janahmadi M, Behzadi G. Iberiotoxin-sensitive large conductance Ca²⁺-dependent K⁺(BK) channels regulate the spike configuration in the burst firing of cerebellar Purkinje neurons. *Brain research*. 2008;1212:1-8.
- .57 Sofiabadi M, Haghdoost-Yazdi H, Mahmudi M, Piri H, Dargahi T, Yaghubidust M. Effect of potassium channel blocker 4-aminopyridine pretreatment on the 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *J Qazvin Univ Med Sci*. 2015; 19 (2): 11-20. Corresponding Address: Hashem Haghdoost-Yazdi, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Shahid Bahonar Blvd, Qazvin, Iran Email: hhaghdoost@gmail.com Tel.98-912.
- .58 Tian C, Zhu R, Zhu L, Qiu T, Cao Z, Kang T. Potassium channels: structures, diseases, and modulators. *Chemical biology & drug design*. 2014;83(1):1-26.
- .59 Rodrigo G, Standen N. ATP-sensitive potassium channels. *Current pharmaceutical design*. 2005;11(15):1915-40.
- .60 Miller C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol*. 2000;1(4):1-5.
- .61 Waszkielewicz A, Gunia A, Szkaradek N, ŚL K. Ion channels as drug targets in central nervous system disorders. *Current medicinal chemistry*. 2013;20(10):1241.

- .62 Grishin A, Ford H, Wang J, Li H, Salvador-Recatala V, Levitan ES, et al. Attenuation of apoptosis in enterocytes by blockade of potassium channels. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2005;289(5):G815-G21.
- .63 Hain TC. Reports of the effect of 4-AP on central disorders.
- .64 Schafer EW, Brunton RB, Cunningham DJ. A summary of the acute toxicity of 4-aminopyridine to birds and mammals. *Toxicology and applied pharmacology*. 1973;26(4):532-8.
- .65 Strupp M, Zwergal A, Brandt T. Episodic ataxia type 2. *Neurotherapeutics*. 2007;4(2):267-73.
- .66 Kalla R, Spiegel R, Claassen J, Bardins S, Hahn A, Schneider E, et al. Comparison of 10-mg doses of 4-aminopyridine and 3, 4-diaminopyridine for the treatment of downbeat nystagmus. *Journal of Neuro-Ophthalmology*. 2011;31(4):320-5.
- .67 Shieh C-C, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacological Reviews*. 2000;52(4):557-94.
- .68 Dowd E, Monville C, Torres EM, Wong LF, Azzouz M, Mazarakis ND, et al. Lentivector-mediated delivery of GDNF protects complex motor functions relevant to human Parkinsonism in a rat lesion model. *European Journal of Neuroscience*. 2005;22(10):2587-95.
- .69 Hernandez-Enriquez B, Arellano R, Moran J. Role for ionic fluxes on cell death and apoptotic volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience*. 2010;167(2):311-298.
- .70 JIA C-h, ZHANG H, LI J, LU Y, YANG X. Pinacidil, an ATP-sensitive potassium channel opener, inhibits ischemic apoptosis via up-regulating Bcl-2 expression in PC12 cells [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*. 2009;7:025.
- .71 Aizenman E, Stout AK, Hartnett KA, Dineley KE, McLaughlin B, Reynolds IJ. Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation. *Journal of neurochemistry*. 2000;75(5):1878-88.
- .72 Shi L, Song N, Jiang H, Wang J, Ma Z, Xie J. Potassium channels are involved in zinc-induced apoptosis in MES23.5 cells. *Journal of neuroscience research*. 2009;87(2):514-21.
- .73 Judge SI, Bever CT. Potassium channel blockers in multiple sclerosis: neuronal K^v channels and effects of symptomatic treatment. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;111(1):59-224.
- .74 Wu Z-Z, Li D-P, Chen S-R, Pan H-L. Aminopyridines potentiate synaptic and neuromuscular transmission by targeting the voltage-activated calcium channel β subunit. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(52):36453-61.
- .75 Kita T, Kita H, Kitai S. Effects of 4-aminopyridine (4-AP) on rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Brain research*. 1985;361(1):10-8.
- .76 Paxinos G. C. Watson C: "The rat brain in stereotaxic coordinates, Ed 6". Academic Press; 2007.
- .77 Fujita M, Nishino H, Kumazaki M, Shimada S, Tohyama M, Nishimura T. Expression of dopamine transporter mRNA and its binding site in fetal nigral cells transplanted into the striatum of 6-OHDA lesioned rat. *Molecular brain research*. 1996;39(1):127-36.
- .78 Borlongan CV, Randall TS, Cahill DW, Sanberg PR. Asymmetrical motor behavior in rats with unilateral striatal excitotoxic lesions as revealed by the elevated body swing test. *Brain research*. 1995;676(1):231-4.
- .79 Lundblad M, Vaudano E, Cenci M. Cellular and behavioural effects of the adenosine A_{2a} receptor antagonist KW-6002 in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of neurochemistry*. 2003;84(6):1398-410.
- .80 Medina-Ceja L, Cordero-Romero A, Morales-Villagr n A. Antiepileptic effect of carbenoxolone on seizures induced by 4-aminopyridine: a study in the rat hippocampus and entorhinal cortex. *Brain research*. 2008;1187:74-81.
- .81 Shimohama S, Sawada H, Kitamura Y, Taniguchi T. Disease model: Parkinson's disease. *Trends in molecular medicine*. 2003;9(8):360-5.
- .82 Yuan H, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *Journal of neuroscience methods*. 2005;144(1):35-45.

- .83 Iancu R, Mohapel P, Brundin P, Paul G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behavioural brain research*. 2005;162(1):1-10.
- .84 González C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzún I, Rojas P, Naranjo D, et al. K⁺ Channels: Function-Structural Overview. *Comprehensive Physiology*. 2012.
- .85 Redman PT, Jefferson BS, Ziegler CB, Mortensen OV, Torres GE, Levitan ES, et al. A vital role for voltage-dependent potassium channels in dopamine transporter-mediated 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Neuroscience*. 2006;143(1):1-6.
- .86 Jin S, Fredholm B. Role of NMDA, AMPA and kainate receptors in mediating glutamate-and 4-AP-induced dopamine and acetylcholine release from rat striatal slices. *Neuropharmacology*. 1994;33(9):1039-48.

Abstract

Background. Potassium (K^+) ions play a pivotal role in the progression of apoptosis. Also activities of many of the enzymes including nucleases and caspases which promote death signals are dependent to these ions.

Objective. Potassium channels participate in cellular and molecular signaling pathways regulating the life and death of neurons To investigate the effect of 4-aminopyridine, a wide-spectrum K^+ channel blocker, on the animal model of Parkinson's disease.

Methods. This experimental study was performed in Qazvin University of Medical Sciences at 2013. Male Rats were received different doses of 4-AP (twice per day, i.p) before stereotaxic injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) until 7 or 15 days after that. 6-OHDA was injected into either medial forebrain bundle (MFB, for acute groups) or striatum (for chronic groups) of the brain. Development and severity of the Parkinsonism were assessed by apomorphine-induced rotational test, elevated body swing test and rotarod test.

Findings. In acute groups, administration of 4-AP at dose 0.5 mg/kg (n=9) had no remarkable effect but at dose 1 mg/kg (n=8) attenuated significantly number of apomorphine-induced rotations and improved motor learning in rotarod test. In chronic groups, although 4-AP at dose of 1 mg/kg (n=7) attenuated significantly number of rotations and improved motor learning but dose 0.5 mg/kg (n=8) was more effective. At this dose, 4-AP not only reduced number of rotations and improved motor learning but also reduced significantly biased swings in elevated body swing test.

Conclusion. Our results show that pretreatment with 4-AP reduced 6-OHDA-induced dopaminergic neuron death in substantia nigra. Since the chronic model of 6-OHDA is more similar to development of PD in human, we recommended the low dose of 4-AP for treatment of this disease.

Keywords: potassium ions, Parkinson's disease, 4-AP, 6-OHDA, substantia nigra, behavioral tests

Effect of pretreatment with potassium channel blocker of 4-aminopyridine on the 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rat

M. Sophiabadi^{*}, H. Haghdooost-Yazdi^{**}, M. Mahmudi^{***}, H. Piri^{****}, T. Dargahi^{*****}, M. Yaghubidust^{*****}

^{*}: Associate Professor of Physiology, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

^{**}: Assistant Professor of Physiology, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

^{***}: Msc Student, Dept. Anatomy, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

^{****}: Assistant Professor of Biochemistry, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

^{*****}: M.sc. Student of Hematology, Iran Blood Transfusion Organ, Tehran, Iran

^{*****}: Medical Student, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Corresponding Author: Hashem Haghdooost-Yazdi

Email : hhaghdooost@gmail.com

Cell phone: +98-9124818325

Running title: Effect of 4-AP on the development of Parkinson's disease

